

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**La combinazione di virus oncolitici veicolati tramite  
cellule staminali mesenchimali con l'attivazione di  
profarmaci aumenta l'efficacia e la sicurezza della terapia  
contro il cancro al colon-retto.**

**Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri  
Dipartimento di Medicina Molecolare - DMM**

**Laureanda: Irene Cavinato**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## INDICE

ABSTRACT.....	3
1. STATO DELL'ARTE: <i>Introduzione al problema biologico</i> .....	5
1.1 Il cancro coloretale.....	5
1.2 Terapia oncolitica.....	5
1.3 Cellule staminali mesenchimali.....	6
1.4 Profarmaci.....	7
1.5 La combinazione per l'aumento di efficacia e sicurezza.....	8
2. APPROCCIO SPERIMENTALE: <i>Descrizione delle metodologie</i> .....	9
2.1 Cellule primarie e colture cellulari.....	9
2.2 Citometria a flusso.....	10
2.3 Saggio di migrazione in vitro.....	10
2.4 Infezione con adenovirus oncolitico.....	10
2.5 Saggio di citotossicità combinato.....	11
2.6 Estrazione del DNA genomico.....	11
2.7 Real-Time PCR.....	12
2.8 Immunoistochimica.....	13
2.9 UPLC/MS-QTOF (Ultra Performance Liquid Chromatography /Mass Spectrometry – Quadrupole Time-of-Flight).....	13
2.10 Farmacocinetica di CRAdNTR in sangue venoso.....	14
2.11 Analisi statistica.....	14
3. RISULTATI: <i>Analisi critica dell'approccio sperimentale</i> .....	15
3.1 Le MSC attivate da TSA presentano un fenotipo superficiale normale.....	15
3.2 TSA aumenta l'espressione di CXCR4 e il tropismo tumorale delle MSC.....	16
3.3 TSA aumenta l'espressione di CAR e la suscettibilità all'infezione adenovirale per le MSC.....	17
3.4 MSC <sup>CRAdNTR</sup> combinate con CB1954 inducono citotossicità nelle cellule di cancro coloretale in presenza di NAb in vitro.....	18
3.5 MSC <sup>CRAdNTR</sup> combinate con CB1954 riducono la crescita del cancro coloretale in presenza di NAb in vivo.....	19
3.6 MSC <sup>CRAdNTR</sup> combinate con CB1954 inducono citotossicità nelle cellule di cancro coloretale in vitro via metaboliti citotossici generati.....	20
3.7 I metaboliti citotossici da CB1954 si ritrovano specificatamente nell'area tumorale e non in altri organi vitali.....	21
4. DISCUSSIONE.....	22
BIBLIOGRAFIA.....	23
APPENDICE: <i>Articolo discusso nell'elaborato</i> .....	23



## **ABSTRACT**

La viroterapia oncolitica è un'emergente modalità di trattamento contro i tumori che porta alla citolisi di cellule tumorali sfruttando la replicazione condizionale all'interno di queste di specifici virus. Le cellule staminali mesenchimali (MSC), grazie al loro tropismo tumorale, costituiscono degli ottimi carrier per i virus oncolitici, i quali a seguito di somministrazione sistemica sono ostacolati da molti fattori nel loro raggiungimento al target.

Nell'articolo analizzato in questo elaborato, le MSC sono state innanzitutto attivate in condizioni di ipossia con tricostatina A (TSA), la quale ha up-regolato l'espressione di CXCR4, aumentando il tropismo al tumore, e CAR, aumentando la suscettibilità all'infezione adenovirale. Le MSC sono state poi caricate con l'adenovirus CRAdNTR, il quale possiede una proliferazione limitata in cellule con un pathway per p53 funzionante, e che codifica per l'enzima E.coli nitroreductasi (NTR). Così facendo, CRAdNTR è protetto dalla neutralizzazione indotta da anticorpi anti-adenovirus e riesce a bersagliare specificatamente tumori al colon-retto con deficienze nel pathway di p53. Combinando il trasporto di CRAdNTR su MSC con il profarmaco CB1954 si è inoltre dimostrato come si generassero dei metaboliti citotossici che inducono oncolisi e inibizione della crescita del tumore senza essere tossici per gli altri organi vitali.

I risultati provano quindi come la combinazione di virus oncolitici veicolati tramite MSC con l'attivazione di profarmaci fornisca un possibile nuovo approccio e strategia di trattamento contro i tumori.



## 1. STATO DELL'ARTE: *Introduzione al problema biologico*

### 1.1 Il cancro coloretale

Il colon-retto è un lungo tubo che costituisce la parte terminale dell'apparato digerente e forma l'intestino crasso. La sua funzione principale è l'assorbimento dell'acqua e dei nutrienti contenuti nel cibo che ingeriamo; inoltre è il luogo in cui avviene la formazione delle feci. Il tumore in questa regione insorge a partire da polipi intestinali pre-esistenti e si forma come conseguenza della crescita incontrollata di cellule epiteliali della mucosa che rivestono internamente l'intestino, dando origine a polipi benigni, i quali possono mutare in formazioni maligne. Il tumore al colon-retto è il quarto cancro più diffuso in entrambi i sessi nel mondo, costituendo il 10% di tutti i tumori diagnosticati, con un tasso di mortalità del 50% per chi lo contrae [1]. Si manifesta con modalità diverse sia a livello clinico sia molecolare. Questo condiziona il tipo di trattamento locale (chirurgia e/o radioterapia) e sistemico (chemioterapia, terapie biologiche e molecolari, immunoterapia), oltre alla sequenza in cui questi tipi diversi di cure vengono offerte al paziente. Se il cancro è diagnosticato durante i primi stadi, è curabile, ma quando è disseminato (IV stadio o Dukes'D) non lo è nella maggior parte dei pazienti. Infatti, l'unica possibilità di cura in questo caso è la resezione chirurgica [2].

Gli odierni trattamenti spesso uccidono anche cellule sane, per cui sono pericolosi e tossici per il paziente. È necessario per questo lo sviluppo di nuovi approcci che eliminino solamente le cellule cancerogene.

### 1.2 Terapia oncolitica

Un'emergente e potenziale modalità di trattamento contro i tumori è la viroterapia oncolitica, la quale sfrutta la naturale, o geneticamente indotta, proprietà di alcuni virus, detti virus oncolitici (OV), di indurre la citolisi di cellule tumorali sensibili e permissive alla loro replicazione selettiva, e la capacità nel contempo di stimolare una risposta immunitaria anti-tumorale.

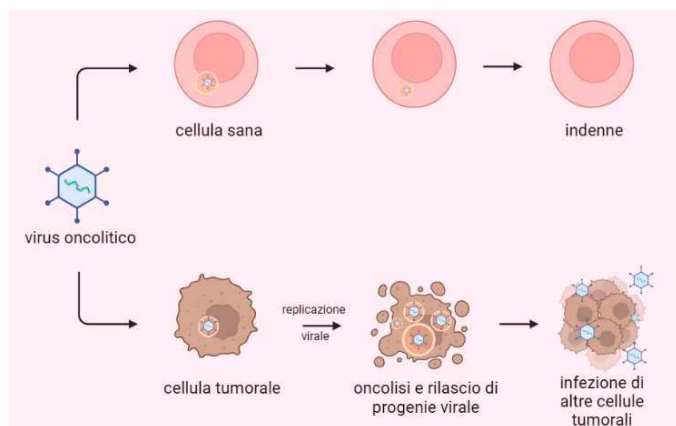


Figura 1: Rappresentazione schematica dei meccanismi di azione dei virus oncolitici.

Grazie alla presenza di recettori espressi specificatamente nelle cellule tumorali, determinati virus, tra cui i più utilizzati sono l'adenovirus, il reovirus, il virus del

morbillo, herpes simplex virus type 1 (HSV-1), ma anche virus animali come il virus della malattia di Newcastle o il vesicular stomatitis virus [3], riescono a legarsi alla loro superficie, rilasciare il proprio genoma e replicarsi. A questo segue poi il normale ciclo litico di un virus, che porta alla liberazione della progenie, causando la lisi della cellula tumorale da cui proviene. Il nuovo pool di virus rilasciato, nonostante si trovi poi in circolo, sarà esclusivamente specifico per le cellule tumorali, rimanendo inefficiente e innocuo nei confronti delle cellule tissutali sane adiacenti [4]. È nella lisi, e quindi distruzione, delle cellule tumorali che appunto risiede la possibile efficacia terapeutica degli OV.

Gli adenovirus, come quello umano di sierotipo 5 (Ad5), sono stati esplorati intensivamente, sia in studi preclinici che trial clinici, in quanto per infettare una cellula si legano ai recettori CAR per coxsackie virus ed adenovirus, i quali possiedono una complicata funzione nell'invasione al tumore [5]. In particolare gli adenovirus a replicazione condizionale (CRAd) stanno venendo utilizzati ultimamente per trattare un ampio spettro di tumori e la loro sicurezza è stata verificata nelle prime fasi di trial clinico [6].

ONYX-015 ad esempio è uno dei primi e più avanzati adenovirus mutati a replicazione condizionale competenti per la terapia contro il cancro [7]. Presenta un codone di stop prematuro nel gene per E1B55k, che, se normalmente funzionante, trascrive l'omonima proteina, la quale si lega alla proteina p53 presente in tutte le cellule. Quest'ultima è definita "soppressore tumorale" perché interviene in molti meccanismi come il blocco del ciclo cellulare o l'induzione in apoptosi delle cellule a seguito di segnali tumorali di danno al DNA, ma non solo, perché quando un virus si lega a p53 tramite E1B-55k, esso cercherà di inattivare il pathway di p53 per permettere la sua replicazione all'interno della cellula, ma questa cercherà di evitare che ciò avvenga inducendo anche in questo caso l'apoptosi cellulare. Il gene per p53 (TP53) risulta danneggiato nelle cellule di alcune tipologie di tumori, come quello al colon-retto, in quanto queste a proprio vantaggio tendono proprio ad inibirne la funzione. Sfruttando quindi la presenza sì della p53, ma il suo pathway non funzionante, ONYX-015 sarà in grado di replicarsi prevalentemente all'interno delle cellule tumorali, perché la sua delezione in E1B-55k impedirà di inattivare il pathway anti-replicazione-virale di p53 normalmente presente nelle cellule sane, rendendo minima la replicazione in queste [7].

Attualmente i OV vengono infusi localmente nel tumore in quanto, nonostante siano efficacemente in grado di attaccare le cellule tumorali, se infusi per via sistemica, gli anticorpi e cellule immunitarie circolanti del paziente vanno a neutralizzarli, rendendo vano il loro impiego. È scopo di numerose ricerche infatti trovare dei carrier funzionali per permettere l'utilizzo di OV anche contro le metastasi [3].

### **1.3 Cellule staminali mesenchimali**

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) - cellule multipotenti non emopoietiche che provengono, e sono facili da ottenere, da un ampio spettro di tessuti come il midollo osseo, il tessuto adiposo, la polpa dentale, la placenta, le membrane amniotiche e il cordone ombelicale, la cui funzione principale è quella di produrre e riparare tessuti scheletrici come ad esempio la cartilagine - possiedono delle caratteristiche interessanti che hanno permesso loro di poter essere considerate,



grazie a risultati di numerosi studi, degli ottimi carrier per i virus oncolitici, trovando così una soluzione al problema esposto al paragrafo precedente.

Innanzitutto sono delle cellule sensibili all'ingresso del OV ma non permissive, questo vuol dire che se infuse per via sistemica, il virus non potrà replicarsi al loro interno, rimanendo in uno stato che possiamo definire di "quiescenza". Ciò è di fondamentale importanza perché previene la neutralizzazione dei OV da parte delle cellule immunitarie del paziente prima che questi riescano a raggiungere la sede di danno tumorale dove svolgeranno la loro funzione. Ma non solo, perché le stesse MSC, anche se infuse in recipienti con HLA non identici al donatore, non attivano il rigetto immunologico delle stesse [8].

Altra caratteristica importante è l'ampio tropismo verso il microambiente tumorale che assicura il raggiungimento del OV, internalizzato nelle MSC, al sito target del tumore [3]. Alcune delle molecole coinvolte in questo orientamento specifico sono gli stessi mediatori infiammatori prodotti dai tessuti lesionati dal tumore come chemochine, citochine e fattori di crescita [8]. Vien da sé che le MSC possiedano degli specifici recettori per queste, e anche che molti studi siano improntati al loro aumento di espressione. Si è ad esempio dimostrato come la crescita in ipossia e l'attivazione indotta da TSA delle MSC induca l'up-regolazione dei recettori per le chemochine CXCR4 e CX3CR1, i quali interagiscono con un fattore secreto da cellule tumorali (lo stromal cell-delivered factor-1 (SDF-1)), permettendo così di aumentare la capacità migratoria verso il tumore. Ma non solo, in quanto permette di aumentare ad una settimana il tempo di trasporto di CRAAd da parte delle MSC verso cellule di cancro colorettaie, senza che venga indotta l'apoptosi di quest'ultime e che vengano attaccate da cellule immunitarie [6] (fig. 2).

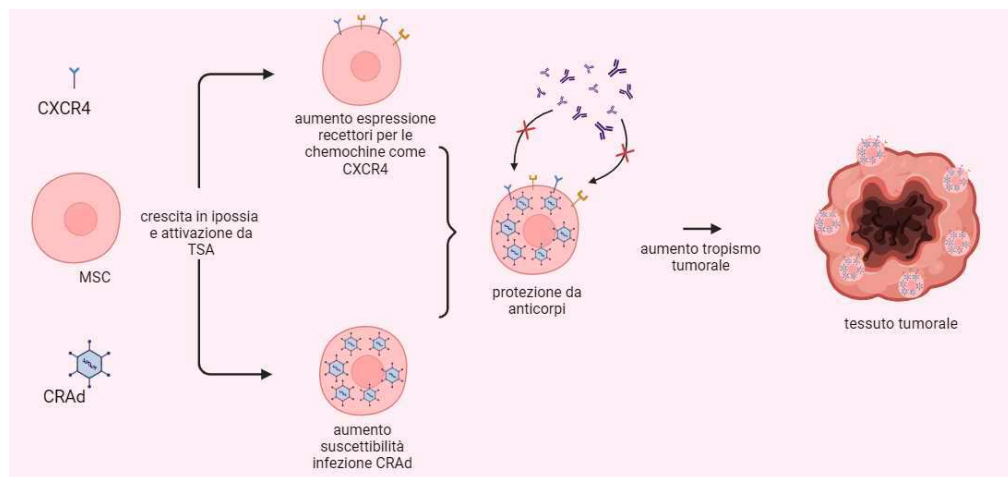


Figura 2: Funzione delle MSC come carrier dei virus oncolitici verso il tumore.

#### 1.4 Profarmaci

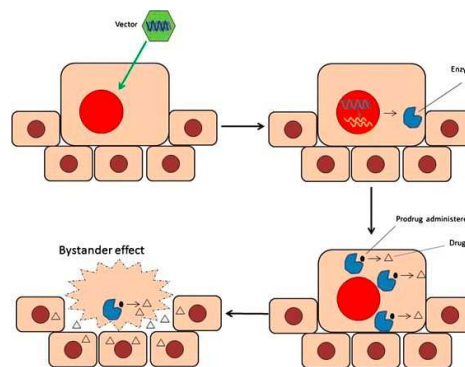
Il trattamento di tumori con comuni farmaci utilizzati generalmente ha un'insufficiente differenziazione tra le cellule sane e quelle tumorali, portando a numerosi e gravi effetti collaterali.

I profarmaci, molecole biologicamente inattive che quando legano ad un particolare substrato si attivano, a tal proposito, possono essere considerati un potente mezzo perché, sfruttando questa loro caratteristica, si stanno sviluppando delle tecniche

finalizzate alla loro attivazione in siti specifici, come ad esempio, e di interesse in questo caso, quelli tumorali. Essendo inattivi, possono essere infusi inoltre per via endovenosa, distribuendosi poi così a livello sistemico, ma potranno esplicare la loro funzione soltanto nel sito target, evitando così che la tossicità di questi farmaci possa incidere sulle cellule sane [9]. Le tecniche che si distinguono sono ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) e GDEPT (Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy).

- **ADEPT:** Il principio di questa tecnica è quello di usare un anticorpo specifico per un antigene associato al tumore come vettore per un enzima attivante il profarmaco. Quindi in primo luogo si bersaglia il tumore con l'enzima ancorato all'anticorpo, e solo in un secondo momento si inietta il profarmaco attivabile da quell'enzima.

- **GDEPT:** Essa utilizza transgeni che codificano per enzimi in grado di attivare i profarmaci. Questi geni, con o senza carrier, sono spesso precisamente modificati in modo che la loro trascrizione in mRNA sia controllata da specifici promotori presenti nelle cellule tumorali, così da ridurre al minimo la possibilità di traduzione dell'enzima attivante nelle poche cellule sane che hanno internalizzato questo gene [9].



**Figura 3: Meccanismo di GDEPT.** Immagine presa da [9].

Un sistema-esempio gene-profarmaco è quello NITROREDUTTASI-CB1945. La nitroreductasi (NTR) è un enzima è prodotto dal batterio *E. coli* e reagisce con il substrato del profarmaco 5-(azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzammide (CB1954) per attivarlo. Una volta attivato produrrà dei potenti intermedi di cross-linking del DNA che possono indurre in apoptosi sia cellule in divisione che non [9]. Il carrier utilizzato nella tecnica GDEPT può essere anche un OV geneticamente modificato [9], ad esempio CRA, precedentemente citato, ingegnerizzato in modo che codifichi per la NTR (CRA<sub>NTR</sub>).

### 1.5 La combinazione per l'aumento di efficacia e sicurezza

Grazie a tutti questi dati alla mano, è stato possibile dimostrare sperimentalmente come la combinazione di OV geneticamente modificati in modo che si replichino solamente in cellule con pathway per p53 non funzionante (cellule di cancro coloretale), codifichino per la NTR, e vengano trasportati da MSC attivate da TSA, con il profarmaco CB1945, aumenti l'efficacia e la sicurezza della terapia oncovirale contro il tumore al colon-retto, fornendo un nuovo approccio di studio per possibili terapie anche contro numerosi altri tumori.

## 2. APPROCCIO SPERIMENTALE: *Descrizione delle metodologie*

### 2.1 Cellule primarie e colture cellulari

Il materiale biologico di partenza è stato coltivato in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) e comprende cellule staminali mesenchimali umane provenienti dal midollo osseo e tre diverse linee cellulari di cancro coloretale umano mutate per p53 non funzionante.

Per quanto riguarda le MSC, alcune sono state coltivate in condizioni di ipossia (94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>) grazie all'utilizzo di incubatori a due sensori d'aria, uno per l'O<sub>2</sub> (l'eccesso viene bilanciato tramite un rilascio di N<sub>2</sub>) e l'altro per CO<sub>2</sub>, ma comunque tutte attivate da TSA chiamandosi da questo punto "primed MSCs". Le primed MSC sono state poi indotte a differenziare in diversi tipi cellulari (osteogenici, adipogenico e condrogenici) grazie a specifici supplementi aggiunti nel DMEM per 14/21 giorni. Le sezioni differenziate sono state individuate tramite specifiche colorazioni:

- Alizarin red S: colorante impiegato per visualizzare e quantificare i depositi di calcio nei campioni biologici, utilizzato infatti per tessuti ossei e mineralizzati, come in questo caso la differenziazione in tessuto osteogenico.
- Oil red O: colorante utilizzato per individuare i lipidi e in questo caso valutare la differenziazione degli adipociti.
- Alcian blue/nuclear fast red: questa combinazione di coloranti è utile per studiare tessuti ricchi in glicosamminoglicani, in particolare i mucopolisaccaridi, presenti in quantità consistenti nel tessuto connettivo o cartilagineo. Nell'esperimento usati infatti per individuare le MSC differenziate nel tipo cellulare condrogenico.

Le cellule tumorali, invece, come detto precedentemente, provengono da tre diverse linee cellulari: HT29, SW480 e SW620.

- HT29: linea di cellule isolate da una donna caucasica di 44 anni con adenocarcinoma al colon. Esprime caratteristiche di cellule intestinali mature come ad esempio enterociti o cellule secernenti muco, e sono state utilizzate oltre che per valutare la citotossicità di MSC<sup>CRA<sub>d</sub>NTR</sup>, per tutti gli esperimenti svolti nell'articolo in esame
- SW480 e SW620: derivano da cellule tumorali dello stesso paziente ma rappresentano differenti stadi dello stesso. Le prime derivano da cellule di tumore al colon e sono utilizzate per studiare gli stadi iniziali dello sviluppo tumorale, mentre le seconde derivano da una metastasi al linfonodo (sempre dello stesso paziente da cui sono state isolate SW480), e grazie al loro alto potenziale metastatico, sono utilizzate per studiare questo fenomeno. Utilizzate nel saggio di citotossicità combinato.

## **2.2 Citometria a flusso**

La citometria a flusso è una tecnica sia qualitativa che quantitativa che fornisce un'analisi multiparametrica di singole cellule o particelle in base alla capacità di queste di deviare la luce (light scattering) o la fluorescenza mentre passano rapidamente davanti ai laser singoli o multipli.

Il processo comporta la sospensione del campione contenente cellule o particelle in una soluzione. Il campione viene poi iniettato nel citometro a flusso e condotto in un canale che via via si restringe il quale porterà le cellule a formare una fila indiana. Ogni cellula così focalizzata passerà singolarmente attraverso il raggio laser, nel cosiddetto "interrogation point", permettendo un'analisi individuale di ognuna di queste. Il raggio laser misura la dispersione della luce visibile e fluorescenza. La prima viene valutata in due direzioni: in avanti (Forward Scatter o FSC) per misurare la dimensione della cellula, e laterale a 90° (Side Scatter o SSC) per indicare la complessità o la granulosità sempre della stessa. La seconda, invece, è indipendente dalla diffusione della luce e viene utilizzata per misurare caratteristiche specifiche delle particelle. Ciò si ottiene etichettando le cellule con marcatori fluorescenti, come proteine fluorescenti (es. GFP), anticorpi legati a fluorocromi (CD3 FITC) o colorazioni con coloranti sempre fluorescenti (Ioduro di propidio, DNA). Nella citometria a flusso infine vi è l'analisi dei dati, dove solitamente viene utilizzato il diagramma a due parametri (dot plot).

Nell'articolo questa tecnologia viene utilizzata per confermare che il fenotipo delle MSC fosse normale e analizzare che il livello di espressione di CXCR4 e CAR dopo il trattamento con TSA fosse aumentato.

Inoltre è stata utilizzata per valutare il rate di infezione adenovirale tramite l'utilizzo di CRADEGFP, analizzando il livello di espressione della proteina fluorescente GFP.

## **2.3 Saggio di migrazione in vitro**

Il saggio di migrazione in vitro è una tecnica utilizzata per lo studio del movimento o della migrazione delle cellule in un ambiente controllato. Nell'articolo analizzato in particolare di questo saggio è stata utilizzata la tipologia chiamata "transwell", dove le cellule di cui si vuole valutare la migrazione sono posizionate in una camera superiore divisa da quella inferiore, dove è depositato un chemoattraente, da una membrana porosa, al fine di valutare un'eventuale risposta migratoria. Le cellule che sono passate attraverso la membrana porosa vengono poi colorate tramite il colorante fluorescente DAPI e microfotografate per osservarne i risultati. La tecnica è stata utilizzata per studiare l'aumento del potere migratorio delle MSC in presenza/assenza di TSA sia senza HT29 nella camera inferiore, che con.

## **2.4 Infezione con adenovirus oncolitico**

Le MSC attivate da TSA in condizioni di ipossia sono state tripsinate e successivamente infettate con CRAAdNTR (PS1217H6) con una molteplicità di infezione (MOI) di 100 vp/cell, dove per MOI si intende il rapporto tra il numero di particelle virali e il numero di cellule bersaglio presenti in uno spazio definito.

Le MSC che con successo hanno caricato il virus vengono poi indicate con MSC<sup>CRAdNTR</sup>.

## 2.5 Saggio di citotossicità combinato

Questo saggio è un test di laboratorio utilizzato per determinare il potenziale effetto di due o più sostanze, come ad esempio farmaci, nella mobilità o nella crescita delle cellule. È spesso infatti utilizzato nel campo della farmacologia e dello sviluppo di farmaci. Il saggio implica un'esposizione delle cellule tipicamente coltivate in una piastra Petri alla sostanza di interesse. Per la visualizzazione dei risultati esistono diverse tecniche: nell'articolo analizzato in particolare vengono osservati tramite l'utilizzo della colorazione cristalvioletto e del saggio MTT che permettono di fornire, grazie a due prospettive, un risultato più affidabile. Entrambe sono state utilizzate per valutare l'effetto citotossico di TSA sulle MSC e di CB1954 combinato con le MSC<sup>CRAdNTR</sup>. Il primo si basa semplicemente sull'osservazione delle piastre Petri, mentre MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) è sempre un saggio colorimetrico, in quanto MTT viene metabolizzato dalle cellule formando un prodotto colorato insolubile detto "formazan", il quale viene solubilizzato, dopo il passare di un tempo di incubazione designato, utilizzando il solvente DMSO. L'effetto della sostanza (CB1954) viene valutata tramite una misura dell'assorbanza (solitamente, e come nell'articolo, con O.D. 570).

## 2.6 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico è un processo fondamentale per ottenere DNA privato dai contaminanti al fine di utilizzarlo a valle in tecniche molecolari come la PCR o la RT-PCR. Il processo inizia collezionando i campioni biologici che contengono il DNA di interesse, in questo caso nell'articolo analizzato partendo da sezioni di tessuti e organi provenienti dal topo - in quanto è nel topo che viene effettuato uno xenotrapianto della linea cellulare HT29 e di MSC<sup>CRAdNTR</sup> seguendo le linee guida di Animal Care e Use Committee della China Medical University - inclusi tumori, cuore, reni, fegato, polmoni, poi tripsinizzati per staccare le cellule adese alla coltura prima della raccolta. Successivamente per procedere all'estrazione del DNA si è utilizzato un kit commerciale, in particolare l'EasyPure Genomic DNA mini kit. Le cellule sono state lisate al fine di rilasciare le macromolecole, tra cui appunto il DNA, tramite micropestelli. Al lisato è stata aggiunta la proteinasi K per eliminare le particelle di tessuto e RNase A per rompere l'RNA. Il DNA è stato poi concentrato utilizzando isopropanolo, ed etanolo per rimuovere le impurità che si andranno a depositare formando un pellet bianco. La fase acquosa, dove è presente il DNA, è stata poi trasferita e nuovamente concentrata tramite isopropanolo, proprio per rendere visibili i filamenti dell'acido nucleico. Dopo gli step di lavaggio ed eluizione la concentrazione di DNA è stata determinata tramite misurazione dei rapporti di densità ottica (OD) 260/280, che se inferiore di 1.8/2 indica una contaminazione da proteine, e 260/230 dove un valore minore di 2 indica contaminazione da carboidrati.

L'estrazione è stata effettuata per permettere di valutare, in secondo luogo con altre tecniche molecolari, l'efficienza di trasporto di CRAdNTR dalle MSC a livello del sito tumorale, analizzando l'espressione del gene adenovirale E1A.

## 2.7 Real-Time PCR

La Real-Time PCR, o PCR quantitativa, è una tecnica di biologia molecolare che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA in maniera molto precisa, veloce e sensibile. Il campione di partenza è costituito da RNA il quale viene poi retrotrascritto a cDNA grazie all'enzima trascrittasi inversa e a primers (o specifici o random), per poi essere utilizzato come stampo per una reazione di amplificazione. Il punto di forza di questa tecnica è l'effettuare un monitoraggio in tempo reale, alla fine di ogni ciclo, della quantità di amplicone che si produce durante il procedere della reazione di PCR. Ciò si ottiene attraverso la misura della fluorescenza emessa da un fluoroforo, come ad esempio il SYBR GREEN, il quale è in grado di legarsi al solco minore della doppia elica ed emettere in maniera quantitativa, ovvero aumentare intensità all'aumentare del DNA, fluorescenza solamente quando vi è legato. L'utilizzo di queste sostanze fluorescenti presenta uno svantaggio, ovvero la possibile presenza di aspecifici che falsificherebbero con una sovrastima il risultato della reazione e che può essere risolto solamente riallestendo daccapo la RT-PCR. Gli aspecifici possono essere rilevati solamente tramite l'analisi del melting point, che determina la variazione di fluorescenza sulla variazione di temperatura, permettendo di visualizzare un picco esattamente al momento in cui avviene la denaturazione del prodotto di PCR. Se all'interno della reazione è presente un aspecifico, è estremamente probabile che la temperatura di melting sia diversa dallo specifico, e ciò sarà visualizzabile tramite la presenza di un doppio picco.

Un metodo più affidabile, ma più costoso, implica l'utilizzo di sonde (es. Taqman) a reporter fluorescenti (processo FRET). Si basa sull'utilizzo di un oligonucleotide (probe) marcato con un fluoroforo ad un'estremità (reporter), mentre nell'altra è presente un quencher il cui scopo è quello di assorbire la fluorescenza emessa dal primo fluoroforo impedendo che questa venga rilevata. Come in una normale PCR, la Taq polimerasi estende il primer forward precedentemente appaiato creando l'amplicone, ma diversamente da quanto accade normalmente, ad un certo punto incontrerà il probe che verrà degradato grazie all'attività esonucleasica 5'-3', annullando la distanza fissata tra il fluoroforo e il quencher, permettendo l'emissione di fluorescenza, sempre quantitativa come nel SYBR GREEN, rilevabile dopo eccitazione tramite laser. Il vantaggio che si acquisisce sta nel fatto che se i primer si appaiassero ad una regione non specifica producendo un aspecifico, questo non verrà rilevato in quanto ad esso non si legherà il probe esattamente complementare invece al prodotto di amplificazione specifico atteso. Quello che si stabilisce con la RT-PCR quindi è una correlazione tra il numero di cicli di amplificazione necessari affinché la fluorescenza diventi rilevabile, il cosiddetto threshold cycle (CT), e la quantità di template iniziale presente inizialmente nel campione: tanto maggiore è, tanto prima verrà raggiunto il ciclo soglia.

Nell'articolo analizzato la trascrittasi inversa utilizzata è la Superscript III Reverse Transcriptase, enzima geneticamente ingegnerizzato a partire dalla MMLV RT al fine di ottenere una generale maggiore efficienza, come ad esempio migliore termostabilità. Come primer sono stati utilizzati oligo(dT) i quali permettono di retrotrascrivere solo l'mRNA in quanto si associano al poliA, e si è utilizzato il fluoroforo SYBR GREEN.

Si è utilizzata al fine di ottenere informazioni come ad esempio il livello di espressione di CXCR4 nelle MSC o quello di CAR sempre su MSC, entrambe a seguito di trattamento con TSA.

## **2.8 Immunoistochimica**

Si tratta un metodo di indagine biochimica eseguita su tessuti al fine di valutare l'espressione di determinate molecole antigeniche mediante l'utilizzo di anticorpi primari specifici per l'antigene o direttamente legati ad una sostanza colorata che ne permette la visualizzazione, o coniugati con un anticorpo secondario che presenta un tracciante enzimatico che è in grado di far precipitare il substrato cromogeno e colorare la zona adiacente all'antigene.

Nell'articolo l'immunoistochimica è stata applicata a sezioni di tessuto tumorale xenotrapiantato nel topo al fine di individuare la presenza di Ad5, e quindi l'effettivo arrivo del virus al tessuto tumorale, e NTR per verificare che il substrato che attiva il profarmaco sia stato effettivamente prodotto.

## **2.9 UPLC/MS-QTOF (Ultra Performance Liquid Chromatography /Mass Spectrometry – Quadrupole Time-of-Flight)**

È una tecnica analitica utilizzata per effettuare una valutazione sia qualitativa che quantitativa tramite sia un'analisi di spettrometria di massa che di cromatografia liquida di specifici componenti presenti all'interno di campioni; nel caso dell'articolo analizzato CB1954 e dei metaboliti citotossici in cui viene convertito dalla NTR.

La spettrometria di massa funziona attraverso un'iniziale ionizzazione dovuta a fasci di elettroni ad energia nota delle molecole del campione e una successiva separazione tramite campi magnetici statici o oscillanti della miscela di ioni in funzione al loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ), per arrivare ad ottenere lo spettro di massa che, in funzione della struttura chimica di ogni composto, è specifico per ognuno di questi. Lo strumento utilizzato è lo spettrometro di massa, costituito da 6 componenti fondamentali: sistema di introduzione del campione, sorgente dove le molecole vengono ionizzate, analizzatore dove gli ioni vengono separati in base al rapporto  $m/z$ , rilevatore, elaboratore e pompe da vuoto. Gli analizzatori utilizzati generalmente possono essere a settore, a trappola ionica o più frequentemente a quadrupolo. Nell'articolo analizzato lo spettrometro utilizzato è chiamato QTOF il quale consiste in due principali componenti: un quadrupolo e un time-of-flight (tradotto "tempo di volo"). Il primo permette il passaggio di ioni con uno specifico  $m/z$  di passare in una cella di collisione dove vengono frammentati in ioni più piccoli, mentre il secondo calcola il tempo necessario agli ioni per viaggiare ad una specifica distanza (retention time). La combinazione dei due permette una

misurazione ad alta risoluzione e confidenza del rapporto m/z. Inoltre lo strumento possiede una sorgente ESI (Electron Spray Ionization) che permette di analizzare molecole termolabili, polari e in un vasto intervallo di massa, ma in modo più importante di poter introdurre il campione in sorgente direttamente in fase liquida. Questo consente di utilizzare come sistema di introduzione del campione un sistema a cromatografia liquida, come appunto UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) nell'articolo, in linea con lo spettrometro di massa. Quest'ultima è una tecnica che permette di separare, identificare e quantificare i componenti in un campione liquido in base alle loro proprietà chimiche che causano un'interazione all'interno della colonnina in cui sono immessi, con la fase stazionaria (solida) o mobile (liquida), con diverse composizioni e proprietà in base al tipo di esperimento che si vuole effettuare; più un componente interagisce fortemente con la fase stazionaria, maggiore, quindi più lento, sarà il suo tempo di eluizione, ed è grazie a queste caratteristiche che si genera una separazione dei componenti.

### **2.10 Farmacocinetica di CRAdNTR in sangue venoso**

La farmacocinetica è lo studio di come il corpo interagisce per l'intera durata dell'esposizione alla somministrazione di sostanze, studiandone quantitativamente l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione. Nell'articolo, tramite somministrazione seriali di CRAdNTR diluito con anticorpi neutralizzanti (NAb) nel seno retro orbitale destro (una vena dietro l'occhio) di tre topi, si è voluto quantificare con RT-PCR il DNA del virus in sangue venoso tramite collezioni in tempi diversi di campioni di sangue dalla coda dei topi, al fine di valutare come la concentrazione del virus cambia nel tempo all'interno del circolo sanguigno fornendo informazioni sulla sua distribuzione ed eliminazione.

### **2.11 Analisi statistica**

I risultati ottenuti dagli esperimenti riportati nell'articolo sono stati ottenuti statisticamente con il programma *GraphPad Prism 5.0* e rappresentati con il valore medio affiancato alla deviazione standard. Per trovare una differenza significativa tra più di due gruppi è stata utilizzata l'analisi della varianza ANOVA, mentre per trovare quella tra due gruppi il *t*-test. I *p*-value < 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

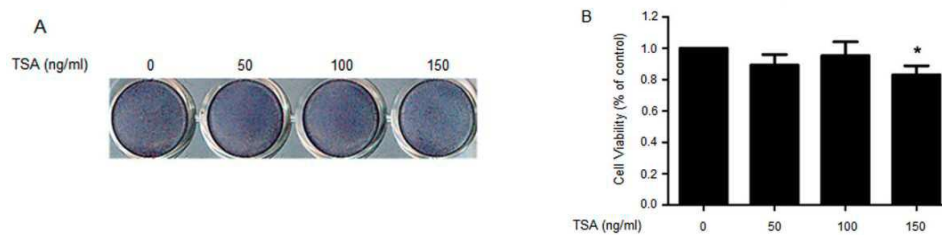


### 3. RISULTATI: *Analisi critica dell'approccio sperimentale*

#### 3.1 Le MSC attivate da TSA presentano un fenotipo superficiale normale

Dati studi precedenti in cui si osservava come TSA (un inibitore delle deacetilasi istoniche HDACi) aumentasse l'espressione dei recettori per le chemochine come CXCR4 in cellule ematopoietiche (staminali o progenitrici) e di CAR in cellule di tumore alla vescica, i ricercatori dell'articolo in analisi hanno voluto investigare, non essendo mai stato fatto prima, gli effetti di TSA nelle MSC.

In primo luogo, essendo una sostanza che può indurre la morte cellulare, si è cercata la concentrazione massima di TSA utilizzabile perché non producesse i suoi effetti citotossici nelle MSC cresciute in condizione di ipossia. Ciò è stato effettuato trattando le MSC con una concentrazione di TSA di 50, 100 e 150 ng/ml per 24 ore e valutandone gli effetti sulla vitalità tramite un saggio di citotossicità combinato con l'utilizzo del colorante cristalvioletto (**fig. 4A**) e il saggio MTT (**fig. 4B**), trovando una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) tra MSC trattate con dosaggio 150 ng/ml di TSA e MSC non trattate.



**Figura 4: Identificazione della concentrazione ottimale di TSA.** Vitalità determinata tramite (A) colorazione cristalvioletto e (B) saggio MTT. L'asterisco indica una differenza significativa ( $P < 0.05$ ) vs MSC non trattate con TSA.

In secondo luogo, decidendo di trattare per la sperimentazione le MSC con una concentrazione di 100 ng/ml di TSA per 24 ore, si è appurato come esse mantenessero un fenotipo da MSC normale, sia in morfologia (osservazione al microscopio), che in capacità proliferative (WST-1 assay), che in potenziale di differenziazione ad osteoblasti, adipociti e condrociti (osservato rispettivamente tramite colorazione al 14esimo giorno con Alizarin Red S, Oil Red O, e al 21esimo giorno con Alcian blue).

Infine si è dimostrato tramite citometria a flusso (**fig. 5**) che nella superficie delle MSC trattate fossero esibiti ad alti livelli marker superficiali positivi delle MSC CD29, CD44 e CD105, non lo fossero i marker negativi (associati tipicamente ad altre cellule) CD31, CD34 e CD45, e non fossero presenti marker associati alla senescenza cellulare (indicativo di come le MSC trattate mantenessero uno stato funzionale).

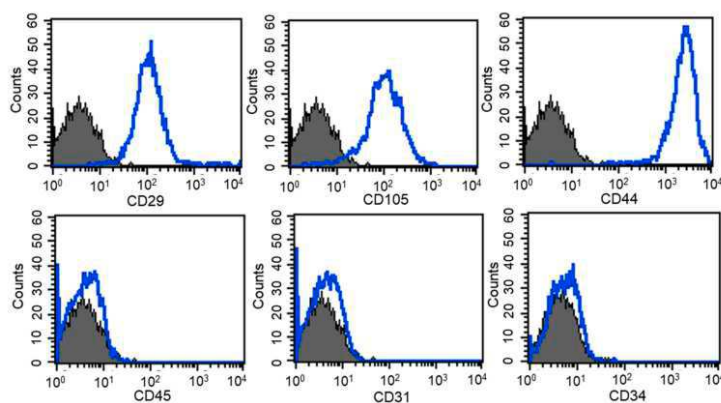


Figura 5: Caratterizzazione tramite citometria a flusso delle MSC dopo il trattamento con TSA.

### 3.2 TSA aumenta l'espressione di CXCR4 e il tropismo tumorale delle MSC

Al fine di poter utilizzare le MSC come carrier per virus oncolitici, risulta innanzitutto cruciale aumentarne il loro tropismo. Come detto precedentemente, volendo studiare gli effetti di TSA sulle MSC, si è cercato di capire se aumentasse anche l'espressione in queste di CXCR4, il quale, essendo responsabile del tropismo tumorale delle MSC, permetterebbe di raggiungere l'obiettivo sopracitato. Due analisi sono state effettuate a tal fine: la RT-PCR (*fig. 6A*) sull'mRNA di CXCR4, ed una citometria a flusso (*fig. 6B*) per la proteina stessa CXCR4 sulla superficie delle MSC. Entrambe portano a risultati positivi: CXCR4 aumenta la sua espressione.

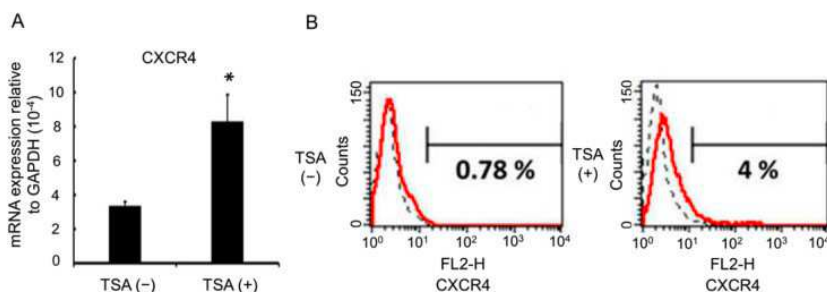
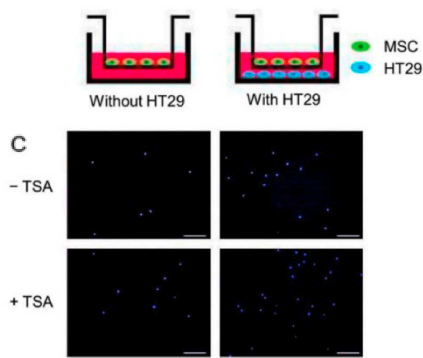


Figura 6: Analisi dell'espressione di CXCR4 su MSC trattate o no con 100 ng/ml di TSA per 24h.

Usate (A) RT-PCR (B) citometria a flusso. L'asterisco indica una differenza significativa per  $P < 0.05$  vs MSC non trattate con TSA (determinata con One-Way ANOVA).

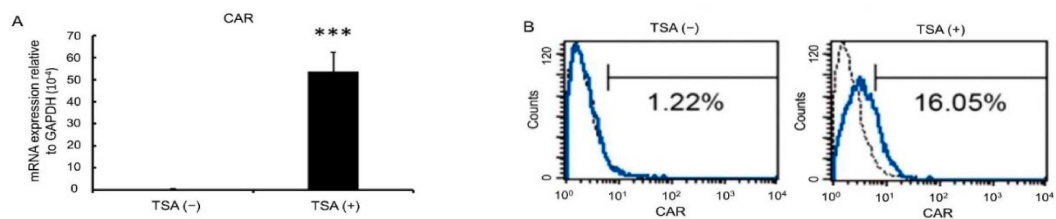
Inoltre, tramite un saggio “transwell” di migrazione in vitro, si è potuto constatare come le MSC trattate con TSA, in presenza di cellule HT29, aumentino le loro capacità migratorie, e quindi il loro tropismo tumorale. In *fig. 7C* si vede, grazie alla microfotografia (delle cellule colorate con DAPI), un aumento considerevole delle MSC che sono riuscite a passare dalla parte opposta del filtro, dove sono presenti le cellule della linea HT29, quando trattate con TSA.



**Figura 7: Capacità di migrazione in vitro delle MSC trattate o meno con TSA, con o senza HT29.** (C) Microfotografie dove si osservano le MSC migrare dall'altra parte del filtro grazie alla colorazione DAPI.

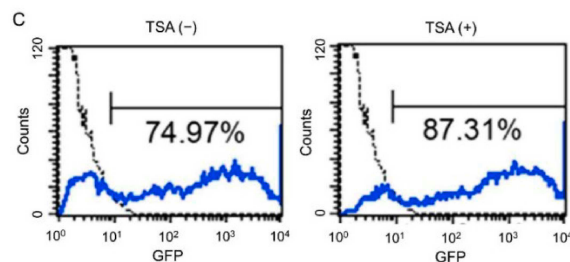
### 3.3 TSA aumenta l'espressione di CAR e la suscettibilità all'infezione adenovirale per le MSC

Sempre concentrandosi sugli effetti di TSA (100ng/ml, 24 ore) sulle MSC, è stato osservato un aumento sostanziale dell'espressione sulla loro superficie dei recettori per coxsackievirus e adenovirus CAR. Ciò è stato dimostrato utilizzando anche in questo caso sia la RT-PCR (*fig. 8A*) che la citometria a flusso (*fig. 8B*).



**Figura 8: Analisi espressione di CAR su MSC trattate con 100 ng/ml per 24h con TSA o senza.** Usate (A) RT-PCR (B) citometria a flusso. I tre asterischi indicano una differenza significativa per  $P < 0.001$  vs MSC non trattate con TSA (determinata con un test t di student).

Le stesse cellule trattate con TSA sono poi state implicate in un'ulteriore analisi relativa alla loro possibile carica virale. Si sono infettate le MSC con CRAdeGFP, un adenovirus geneticamente ingegnerizzato oltre che per una replicazione condizionale anche per possedere il gene che codifica la proteina fluorescente GFP. L'intensità di questa ha permesso, tramite citometria a flusso (*fig. 9C*), di tracciare l'infezione virale e osservarne un aumento, dimostrando quindi un'aumentata suscettibilità delle MSC all'infezione adenovirale, rendendole ospiti più ricettivi per le terapie a base di OV.



**Figura 9: Carica virale CRAdeGFP.** Analisi espressione GFP tramite citometria a flusso (C).

### 3.4 MSC<sup>CRAAdNTR</sup> combinate con CB1954 inducono citotossicità nelle cellule di cancro coloretale in presenza di NAb in vitro

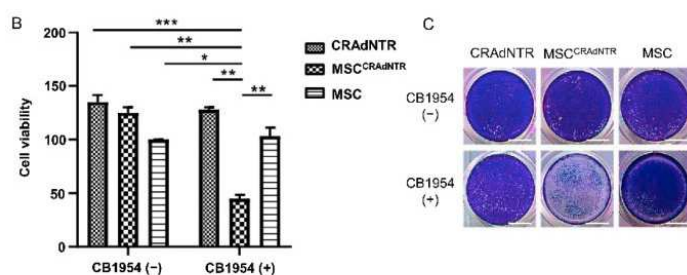
Il problema principale dei OV infusi per via sistemica, come affermato al paragrafo 1.2, riguarda la loro neutralizzazione da parte degli anticorpi del paziente, essendo essi riconosciuti come non self. Per ottenere risultati quanto più attinenti a ciò che accade nella pratica, i ricercatori perciò hanno condotto i successivi esperimenti - sia in vitro che in vivo - in presenza di anticorpi neutralizzanti (NAb), coinvolgendo sia l'attivazione del profarmaco CB1954, che MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, su tre linee cellulari di cancro coloretale deficienti funzionalmente per p53 HT29, SW40 e SW620.

Innanzitutto si è osservato come CRAAdNTR da solo, quindi non trasportato dalle MSC, non sia in grado di compiere efficacemente la sua azione citotossica sulle HT29, dimostrando di venir bloccato massicciamente dagli NAb. Ciò è stato eseguito sia trattando con CB1954 che non, indicando comunque un'azione non citotossica di CRAAdNTR stesso, e quindi un'ulteriore conferma della sua neutralizzazione.

Diversamente, quando aggiunte alla coltura di cellule HT29, le MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, solo in presenza però del profarmaco, rivelano un elevato potere citotossico. Ciò suggerisce innanzitutto che le MSC hanno protetto con successo l'adenovirus dalla neutralizzazione anticorpale, permettendo così il loro raggiungimento alle cellule di cancro coloretale, e in secondo luogo che la combinazione con il profarmaco potenzi in maniera sostanziale la citotossicità di CRAAdNTR.

Per completezza lo studio è stato effettuato anche solamente con MSC attivate da TSA, che però non segnalano alcun effetto citotossico.

Queste valutazioni sono state effettuate tramite un saggio di citotossicità combinato: un saggio MTT (**fig. 10B**) dove è possibile osservare un'importante diminuzione della vitalità cellulare della linea HT29 trattate con MSC<sup>CRAAdNTR</sup> combinato al profarmaco CB1954, e la colorazione cristalvioletto (**fig. 10C**) dove è presente lo stesso risultato ma si osserva grazie alla grande diminuzione della macchia colorata sulla piastra. Lo stesso esperimento è stato condotto sulle cellule della linea SW480 e SW620 portando agli stessi risultati.

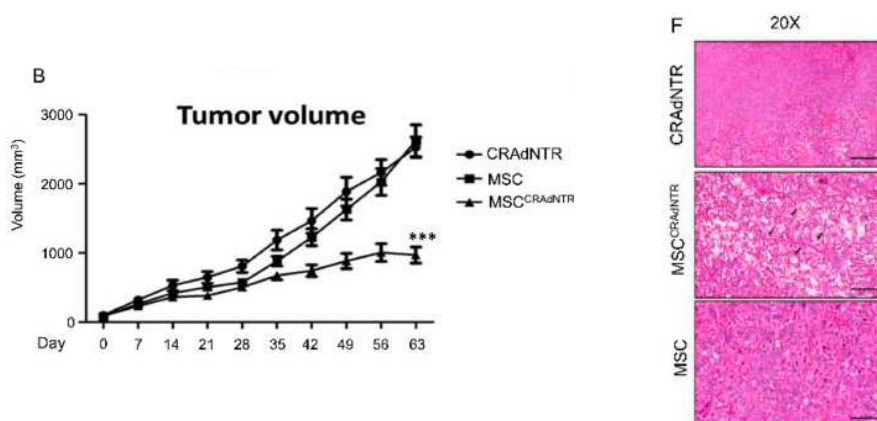


**Figura 10: La combinazione di MSC<sup>CRAAdNTR</sup> con CB1954 induce citotossicità su cellule di cancro coloretale in presenza di NAb in vitro.** Saggio MTT (B) e colorazione cristalvioletto (C).

Inoltre per dimostrare ulteriormente come CRAAdNTR fosse presente nelle cellule tumorali della linea HT29 solo quando trasportato dalle MSC (MSC<sup>CRAAdNTR</sup>), è stata eseguita una RT-PCR per il gene adenovirale E1A (un gene espresso durante la replicazione adenovirale) sui tessuti trattati sia con solo CRAAdNTR, che con solo MSC, che con MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, confermando solo in queste ultime la presenza del gene.

### 3.5 MSC<sup>CRAdNTR</sup> combinate con CB1954 riducono la crescita del cancro coloretale in presenza di NAb in vivo

Se nel paragrafo precedente si faceva riferimento al potenziale citotossico di CRAdNTR trasportato dalle MSC combinato con il profarmaco CB1954 in presenza di NAb in vitro, in questo paragrafo invece ne si analizzano gli effetti in vivo. Lo studio è così organizzato: sono stati effettuati tre esperimenti indipendenti (come fatto per l'esperimento al paragrafo 3.4) iniettando per via endovenosa, insieme ai NAb, su topi immunodeficienti portatori di cancro coloretale (HT29), CRAdNTR da solo, primed MSC da sole, e MSC<sup>CRAdNTR</sup>, ai quali poi per via intraperitoneale è stata somministrata ogni settimana (per un totale di due cicli) per cinque giorni consecutivi, una dose di 25 mg/kg di CB1954, ritardando il terzo ciclo di 20 giorni dal secondo. Innanzitutto si è notato come la crescita tumorale, osservando le asportazioni chirurgiche, diminuisca solamente nei topi trattati con MSC<sup>CRAdNTR</sup> (si veda grafico in **fig. 11B**), e come, allo stesso modo, tramite analisi e osservazione di vetrini istologici colorati con ematossilina ed eosina (**fig. 11F**), l'area necrotica aumenti significativamente solo nei topi trattati con MSC<sup>CRAdNTR</sup>. Inoltre, sempre solamente nel gruppo MSC<sup>CRAdNTR</sup>, il tumore continua la sua decrescita fino a circa il cinquantesimo giorno. CRAdNTR quindi possiede un'attività di replicazione robusta, che risulta in un effetto citolitico, di conseguenza terapeutico, prolungato.

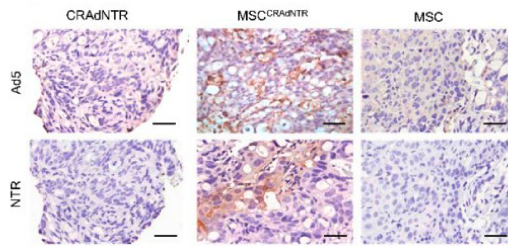


**Figura 11: Riduzione crescita cancro coloretale.** Grafico (B) che segue andamento volume tumore a seguito di trattamento. I tre asterischi indicano una differenza significativa ( $p < 0.01$ ) rispetto agli altri gruppi (determinata con One-Way ANOVA). Colorazione con ematossilina & eosina (F) per analisi istologica. Scala in (F) 100  $\mu\text{m}$ .

Così come è stato effettuato in vitro, gli studiosi hanno voluto anche verificare la presenza del gene E1A nelle sezioni tumorali, quindi l'effettivo arrivo del virus al sito tumorale, tramite estrazione del DNA genomico e poi RT-PCR, mostrandone positività solamente in quelli con MSC<sup>CRAdNTR</sup>.

Inoltre campioni di sangue provenienti dalla coda dei topi infusi con  $2 \times 10^8$  particelle virali di CRAdNTR sono stati raccolti a 10, 30, 90, 180 e 360 minuti post infusione per studi di farmacocinetica, portando come risultato ad una rilevazione, con RT-PCR, del genoma virale nel plasma solo fino a 6 ore post infusione.

Infine tramite immunohistochimica (**fig. 12**) si è osservato solo i tumori trattati con MSC<sup>CRAdNTR</sup>, una positività per NTR e Ad5 (proteina del capsido dell'adenovirus).

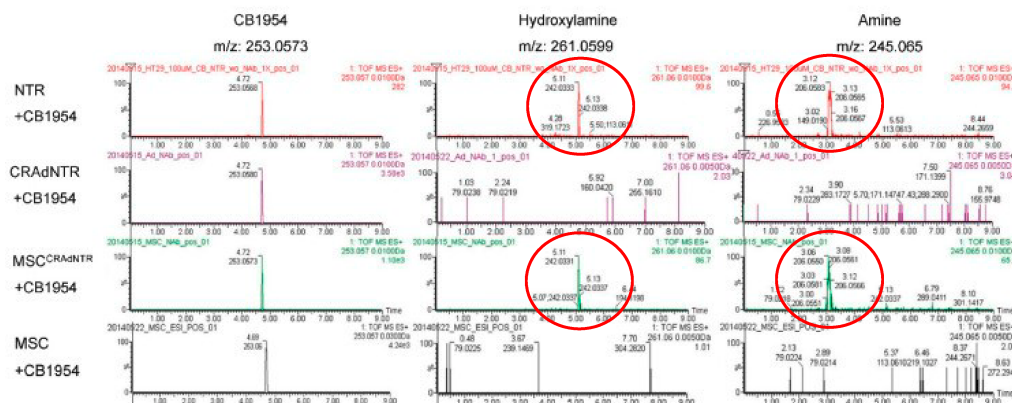


**Figura 12: Analisi immunoistochimica per Ad5 e NTR.**  
Scala di 50  $\mu\text{m}$

Tutti questi risultati portano a concludere ancora che le MSC permettono a CRAdNTR di raggiungere il sito tumorale senza essere neutralizzati dai NAb, e che la combinazione con CB1954 (tecnica GDEPT NTR/CB1954) potenzia l'effetto citolitico, culminando nella riduzione anche in vivo della crescita tumorale.

### 3.6 MSC<sup>CRAdNTR</sup> combinate con CB1954 inducono citotossicità nelle cellule di cancro coloretale in vitro via metaboliti citotossici generati

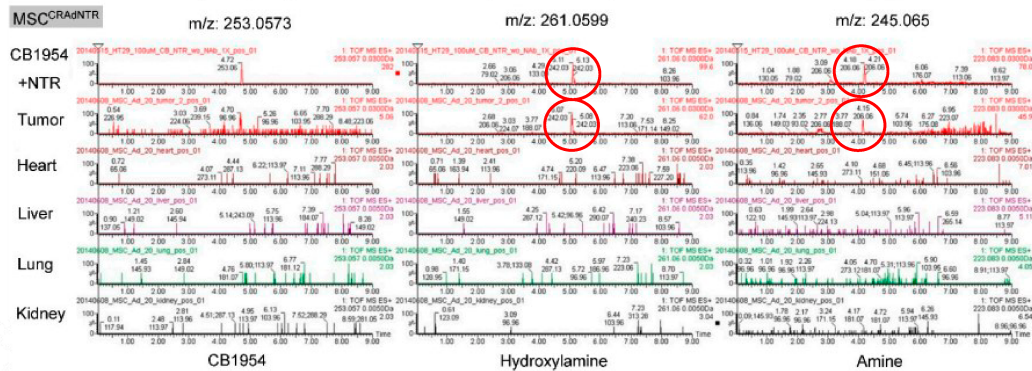
Come detto nel paragrafo 1.4.2, la tecnica GDEPT coinvolge enzimi in grado di attivare i profarmaci. Nell'articolo analizzato il profarmaco utilizzato è appunto CB1954, il quale viene attivato dalla NTR espressa da CRAdNTR. Nel momento in cui viene attivato, il profarmaco produce dei metaboliti citotossici quali 2-idrossilammina, 4-idrossilammina, 2-ammina e 4-ammina. I ricercatori hanno confermato, tramite l'utilizzo della tecnica UPLC-MS/QTOF, che l'effetto citotossico in vitro su cellule della linea HT29 trattate con MSC<sup>CRAdNTR</sup> (mentre quelle trattate con solo primed MSC e solo CRAdNTR no), era causato dalla produzione dei metaboliti citotossici del profarmaco CB1954. Ciò è stato constatato osservando in primo luogo che i valori m/z rilasciati dallo spettrometro di massa hanno avuto i risultati attesi per CB1954 ( $[M+H]^+ = 253.057$ ), 2-hydroxylamine and 4-hydroxylamine ( $[M + Na]^+ = 261.0599$ ), and 2-amine and 4-amine, ( $[M + Na]^+ = 245.065$ ). In secondo luogo degli stessi, calcolando il retention time (**fig. 12**) nel medium di coltura in vitro, e confrontandolo a quello ottenuto dalla reazione di NTR con CB1954 (prima riga **fig. 13**), si vede che per le idrossilammine e le ammine, il retention time (rispettivamente 5.1 e 3.1 min) che si osserva nel gruppo MSC<sup>CRAdNTR</sup> (terza riga **fig. 13**), è come nello standard, quindi la reazione è avvenuta.



**Figura 13: Rilevamento con UPLC/MS-QTOF dei metaboliti citotossici di CB1954 nel medium di cellule della linea HT29.** Soluzione di NTR+CB1954 riferiti ai metaboliti standard prodotti dalla reazione di CB1954 con NTR esogena mostrati nella prima riga. I cerchi rossi evidenziano i picchi uguali allo standard per MSC<sup>CRAdNTR</sup>+CB1954.

### 3.7 I metaboliti citotossici da CB1954 si ritrovano specificatamente nell'area tumorale e non in altri organi vitali

Un ulteriore livello di analisi è stato quello di investigare se i metaboliti citotossici si producessero esclusivamente nella regione tumorale e non negli altri organi vitali come cuore, fegato, polmoni e reni. Innanzitutto tramite l'utilizzo di UPLC/MS-QTOF è stato dimostrato che solo nei topi trattati con MSC<sup>CRAdNTR</sup> ed esclusivamente nel tumore, sono visualizzabili i profili di retention time (*fig. 14*) per le idrossilammine e per le ammine, mentre per quanto riguarda i topi trattati con MSC da sole così come CRAdNTR da solo, i picchi non sono presenti in nessun caso.



**Figura 14: Rilevamento con UPLC/MS-QTOF dei metaboliti citotossici di CB1954.** Nella prima riga i metaboliti standard della reazione di CB1954 con NTR esogena, a seguire ricerca dei metaboliti citotossici su tumore, cuore, fegato, polmoni e reni di topi portatori di tumore HT29 e trattati con MSC<sup>CRAdNTR</sup>. I cerchi rossi evidenziano i picchi uguali allo standard per MSC<sup>CRAdNTR</sup>+CB1954 nella sola zona tumorale.

Secondariamente gli RNA del tumore xenotrapiantato, del cuore, del fegato, dei polmoni e dei reni di topi trattati con MSC<sup>CRAdNTR</sup>, sono stati sottoposti ad un'analisi di RT-PCR (*fig. 15*) per l'espressione del gene adenovirale E1A, dimostrandone anche in questo caso la sua presenza esclusivamente nel tumore.



**Figura 15: Analisi RT-PCR per l'espressione del gene adenovirale E1A (675bp).**

Gli esiti collettivamente portano ad un'evidenza sostanziale sulla sicurezza dell'approccio terapeutico trattato in questo articolo: MSC<sup>CRAdNTR</sup> specificatamente si dirigono verso il sito tumorale, e l'effetto di lisi tumorale è causato dai metaboliti citotossici di CB1954.

#### 4. DISCUSSIONE

Concludendo, le MSC, grazie ad alcune loro proprietà quali un tropismo tumorale, la capacità di internalizzare un virus, di essere vitali per un tempo sufficiente al trasporto virale verso il sito target, e la loro attività immunosoppressiva, stanno ricevendo attenzioni per il loro utilizzo come potenziale carrier di OV soprattutto perché ne permetterebbe un delivery sistemico e quindi la possibilità di agire contro tumori che non possono essere direttamente raggiunti, così come le metastasi.

Rifacendosi a nuove strategie in corso di studio dove si modifica in maniera epigenetica con HDACi (come TSA) al fine di indurre specifiche caratteristiche in cellule, tra cui anche staminali, per applicazioni cliniche, nell'articolo in analisi, riassumendo, le MSC sono state trattate per 24 ore con TSA, dimostrando come non aumentasse solamente sulla loro superficie l'espressione dei recettori per CXCR4, quindi il tropismo tumorale, ma anche l'espressione dei recettori CAR, per cui la suscettibilità all'infezione da CRAdNTR, il tutto mantenendo inalterato il loro fenotipo e vitalità cellulare. Tuttavia, a causa del fatto che gli animali devono essere sacrificati per l'analisi dei tessuti, in questo studio, per minimizzarne il numero, non sono stati condotti esperimenti animali per verificare l'aumento del tropismo tumorale delle MSC anche in vivo, ma solamente tramite saggi in vitro, ponendo così un limite all'indagine. Questo però potrebbe essere superato utilizzando tecniche di in vivo live imaging, che permetterebbero di visualizzare e tracciare le cellule durante la migrazione in vivo, senza dover effettuare sacrifici, anche se purtroppo con una risoluzione più bassa e non sempre riuscendo a penetrare in tessuti più profondi.

Inoltre, rifacendosi a studi in cui i OV grazie alla loro replicazione selettiva stanno venendo studiati anche come vettori di geni con attività terapeutica, i ricercatori di questo articolo hanno sfruttato la NTR, codificata dal virus oncolitico CRAdNTR, per convertire il profarmaco CB1954 nei suoi metaboliti citotossici, ottenendo come promettente risultato un'aumentata lisi tumorale e riduzione della crescita del cancro coloretale, contemporaneamente mantenendo minimi gli effetti collaterali sugli altri organi vitali. Sfortunatamente però i 4 metaboliti citotossici, di cui soltanto 4-idrossilammina e 2-ammina possiedono l'attività più forte, sono isomeri (tra le due ammine e le due idrossilammine) con la stessa formula chimica e peso ma con gruppi funzionali e struttura diversi, che rende difficile, anzi impossibile, distinguerli con la tecnica di UPLC/MS-QTOF. Per far fronte a ciò dovrebbe essere impiegata la tecnica della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, la quale però è molto costosa e difficilmente presente nei laboratori.

Gli sviluppi degli approcci che coinvolgono i OV sono da considerarsi ancora in una relativa fase iniziale, per cui il delivery intratumorale in situ degli stessi è ancora la pratica standard nella ricerca clinica e numerosi sono gli aspetti ancora sconosciuti. Comunque il lavoro dell'articolo in esame presenta un approccio innovativo e interessante di grande sinergia tra le MSC caricate con OV, con la terapia GDEPT per futuri trattamenti contro metastasi tumorali, uno dei problemi più grandi a cui far fronte nella ricerca contro il cancro.



## BIBLIOGRAFIA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: CA Cancer J Clin. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
2. Díaz-Cantón EA, Pazdur R. **Tratamiento médico del cáncer colorrectal** [Medical treatment of colorectal cancer]. Medicina (B Aires). 1996;56(4):414-22. Spanish. PMID: 9138348.
3. Seyed-Khorrami SM, Soleimanjahi H, Soudi S, Habibian A. **MSCs loaded with oncolytic reovirus: migration and in vivo virus delivery potential for evaluating anti-cancer effect in tumor-bearing C57BL/6 mice.** Cancer Cell Int. 2021 May 1;21(1):244. doi: 10.1186/s12935-021-01848-5. PMID: 33933086; PMCID: PMC8088007.
4. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. **Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn.** Cancer Sci. 2016 Oct;107(10):1373-1379. doi: 10.1111/cas.13027. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27486853; PMCID: PMC5084676.
5. Fan LS, Chen G, Ma D. **Research advance on role of Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in tumor progression.** Ai Zheng. 2009 Mar;28(3):333-6. PMID: 19619453.
6. Huang, Y.F.; Chen, M.J.; Wu, M.H.; Hung, S.C. **The use of hypoxic cultured mesenchymal stem cell for oncolytic virus therapy.** Cancer Gene Ther. 2013, 20, 308–316.
7. Ries S, Korn WM. **ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus.** Br J Cancer. 2002 Jan 7;86(1):5-11. doi: 10.1038/sj.bjc.6600006. PMID: 11857003; PMCID: PMC2746528.
8. BS, Pelagalli A, Passaro N, Zannetti A. **Tumor-educated mesenchymal stem cells promote pro-metastatic phenotype.** Oncotarget. 2017 Aug 14;8(42):73296-73311. doi: 10.18632/oncotarget.20265. PMID: 29069870; PMCID: PMC5641213
9. Zhang, J., Kale, V. & Chen, M. **Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy.** AAPS J 17, 102–110 (2015).

## APPENDICE: *Articolo discusso nell'elaborato*

Ho CT, Wu MH, Chen MJ, Lin SP, Yen YT, Hung SC. **Combination of Mesenchymal Stem Cell-Delivered Oncolytic Virus with Prodrug Activation Increases Efficacy and Safety of Colorectal Cancer Therapy.** Biomedicines. 2021 May 13; 9(5):548. doi: 10.3390/biomedicines9050548. PMID: 34068264; PMCID: PMC8153168.



## Article

# Combination of Mesenchymal Stem Cell-Delivered Oncolytic Virus with Prodrug Activation Increases Efficacy and Safety of Colorectal Cancer Therapy

Chun-Te Ho <sup>1,2</sup>, Mei-Hsuan Wu <sup>3</sup>, Ming-Jen Chen <sup>4</sup> , Shih-Pei Lin <sup>3</sup>, Yu-Ting Yen <sup>1,2</sup> and Shih-Chieh Hung <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Drug Development Center, Institute of New Drug Development, Institute of Biomedical Sciences, School of Medicine, China Medical University, Taichung 404, Taiwan; homenjer@gmail.com (C.-T.H.); d92449001@ntu.edu.tw (Y.-T.Y.)

<sup>2</sup> Integrative Stem Cell Center, Department of Orthopaedics, China Medical University Hospital, Taichung 404, Taiwan

<sup>3</sup> Institute of Clinical Medicine, School of Medicine, National Yang-Ming University, Taipei 112, Taiwan; hsuan0425@hotmail.com (M.-H.W.); cutebettykimo@yahoo.com.tw (S.-P.L.)

<sup>4</sup> Department of Surgery, MacKay Memorial Hospital & Department of Medicine, MacKay Medical College, New Taipei City 252, Taiwan; mjchen@mmc.edu.tw

\* Correspondence: hung3340@gmail.com or D96743@mail.cmuh.org.tw; Tel.: +886-42-205-2121 (ext. 7728); Fax: +886-42-233-3922



**Citation:** Ho, C.-T.; Wu, M.-H.; Chen, M.-J.; Lin, S.-P.; Yen, Y.-T.; Hung, S.-C. Combination of Mesenchymal Stem Cell-Delivered Oncolytic Virus with Prodrug Activation Increases Efficacy and Safety of Colorectal Cancer Therapy. *Biomedicines* **2021**, *9*, 548. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050548>

Academic Editor: Yoku Hayakawa

Received: 16 April 2021

Accepted: 11 May 2021

Published: 13 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Although oncolytic viruses are currently being evaluated for cancer treatment in clinical trials, systemic administration is hindered by many factors that prevent them from reaching the tumor cells. When administered systemically, mesenchymal stem cells (MSCs) target tumors, and therefore constitute good cell carriers for oncolytic viruses. MSCs were primed with trichostatin A under hypoxia, which upregulated the expression of CXCR4, a chemokine receptor involved in tumor tropism, and coxsackievirus and adenovirus receptor that plays an important role in adenoviral infection. After priming, MSCs were loaded with conditionally replicative adenovirus that exhibits limited proliferation in cells with a functional p53 pathway and encodes Escherichia coli nitroreductase (NTR) enzymes (CRAdNTR) for targeting tumor cells. Primed MSCs increased tumor tropism and susceptibility to adenoviral infection, and successfully protected CRAdNTR from neutralization by anti-adenovirus antibodies both in vitro and in vivo, and specifically targeted p53-deficient colorectal tumors when infused intravenously. Analyses of deproteinized tissues by UPLC-MS/QTOF revealed that these MSCs converted the co-administered prodrug CB1954 into cytotoxic metabolites, such as 4-hydroxylamine and 2-amine, inducing oncolysis and tumor growth inhibition without being toxic for the host vital organs. This study shows that the combination of oncolytic viruses delivered by MSCs with the activation of prodrugs is a new cancer treatment strategy that provides a new approach for the development of oncolytic viral therapy for various cancers.

**Keywords:** oncolytic virus; mesenchymal stem cell; prodrug activation; p53 mutant tumor; colorectal cancer

## 1. Introduction

Colorectal cancer is a major global health problem owing to its high prevalence and mortality rates, and it is the fourth most common cancer worldwide, including in many parts of the western world [1]. The most prevalent problem in cancer therapy is the regrowth and metastasis of malignant cells after standard treatment with surgery, radiation, and/or chemotherapy. Colorectal cancer recurrence can occur either locally or at a distant site; therefore, metastatic colorectal cancer remains difficult to treat effectively.

Oncolytic virotherapy is an emerging treatment modality with great therapeutic potential that uses replication-selective viruses to replicate specifically in tumors to destroy tumor cells by cytolysis [2]. Once the tumor cells are destroyed, viral progenies are released,

allowing them to continuously hijack the neighboring tumor cells. This property is either inherent or genetically engineered [3]. Human adenovirus serotype 5 (Ad5) is one of the most widely studied engineered oncolytic viruses in preclinical studies and clinical trials [4]. When adenoviruses target host cells, coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) plays an important role in the infection process [5,6]. Conditionally replicative adenovirus (CRAd) has recently been used in preclinical studies and clinical trials to treat a broad range of cancers [7]. ONYX-015, an adenovirus made conditionally replicative by E1B-55k gene deletion [8,9], is a potential candidate for treatment of p53-deficient cancers, with minimum replication in cells with a functional p53 pathway [10]. The safety and viral pharmacokinetics of CRAd for cancer therapy had been studied in early phase clinical trials [11] and the viral genomes in plasma were only detected in early hours following IV infusion with  $2 \times 10^{11}$  to  $2 \times 10^{12}$  particles and were not detected at 8 h [8]. However, its antitumor efficacy has not been well documented, since there are many systemic barriers that prevent it from reaching tumor cells when administered systemically [12].

Multipotent stromal cells (MSCs) possessing self-renewal and multipotent capacities are inherently tumor-homing [13–15], and can be isolated, expanded, and transduced, making them viable candidates for cell carriers to deliver oncolytic viruses [16]. The biodistribution and cell-fate tracking of human MSCs following IV infusion into mice bearing human tumor xenografts have been well studied before [13]. They were mainly detected at the tumor inoculation sites, grew as the tumors grew, and then differentiated into tumor stroma, endothelial cells of tumor capillaries and small blood vessels, hair follicle cells, and basal cells of dermis overlaying the s.c. tumor xenografts [13]. The migration of MSCs is induced by several chemokine/chemokine receptor-mediated signaling pathways, in which the chemokine receptor CXCR4 plays a crucial role with regard to tumor tropism, as it allows dynamically interacting with the host by responding to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) secreted by tumors [17]. Previous studies have also shown that MSCs expanded under hypoxic conditions (referred to as hypoxic MSCs) exhibit greater proliferation, reduced senescence, increased stemness, and increased homing to tumor sites via upregulation of CXCR4 [16,18,19]. Moreover, hypoxic MSCs are immunologically privileged, and could be allotransplanted, without causing severe adverse effects [20].

Gene-directed enzyme-prodrug therapy (GDEPT), also known as suicide gene therapy, is based on the delivery of a foreign gene that encodes a prodrug-activating enzyme, followed by systemic administration of a nontoxic prodrug that is subsequently converted into a potent cell-killing drug [21]. The concept of using a bacterial nitroreductase (NTR) enzyme to react with its substrate prodrug 5-(azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954), and produce potent DNA cross-linking intermediates that can induce apoptosis in both dividing and non-dividing cells, is a promising and emerging GDEPT strategy that has reached clinical trials [22,23]. According to this evidence, the combination of CRAd and CB1954 is a new cancer treatment strategy for p53-deficient cancers. However, it remains to be elucidated whether the use of MSC as a cell carrier can further improve its anti-cancer efficacy and safety. In the current study, we first improved the susceptibility of MSCs to CRAd infection, and further increased MSC tumor tropism. We then combined MSC-delivered CRAd and prodrug activation to kill p53-deficient colorectal cancer cells both in vitro and in vivo. Through this combinational approach, we are able to increase both efficacy and safety of cancer therapy.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture

Human primary MSCs from bone marrow were harvested with the approval of Institutional Review Board and prepared as described previously [24]. The cells were seeded at 50 cells/cm<sup>2</sup> and grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, Paisley, Scotland, UK), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, Scotland, UK), 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin sulfate and 25 µg/mL amphotericin B (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For

the hypoxic culture, MSCs were maintained as previously described [19]. The MSCs were cultured in a gas mixture composed of 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 1% O<sub>2</sub>, which was maintained using an incubator with two air sensors: one for CO<sub>2</sub> and the other for O<sub>2</sub>. The O<sub>2</sub> concentration was achieved and maintained via the delivery of N<sub>2</sub> from a tank containing pure N<sub>2</sub>. If the percentage of O<sub>2</sub> exceeded the desired level, N<sub>2</sub> gas was automatically injected into the system, to displace the excess O<sub>2</sub>. The passage number of MSCs used in this study was no more than five. MSCs were treated with 100 ng/mL Ttichostatin A (TSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 24 h given a substitution name as primed MSCs, applied in a subsequent study. HT29, SW480, and SW620, p53-mutant human colorectal cancer cell lines [25], were obtained from the American type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and grown in DMEM supplemented with 10% FBS. For proliferation assay, cells were seeded at a density of 1000 cells/well in 96-well plate, followed by recover and assay with WST-1 kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) at indicated time periods. For osteogenesis, cells were induced in DMEM supplemented with 10% FBS, 10<sup>-8</sup> M dexamethasone (D1756, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), 50 ng/mL ascorbic acid (A4406, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), and 10<sup>-2</sup> M β-glycerophosphate (50020, Fluka, Buchs, Switzerland) for 14 days. For adipogenesis, cells were induced with DMEM supplemented with 10% FBS, 0.05 mM indomethacin (I7378, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), 10 μg/mL insulin (I0516, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), 10<sup>-8</sup> M dexamethasone, 50 μg/mL ascorbic acid, and 0.45 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, I5879, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) for 14 days. For chondrogenesis, 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL was transferred into 15-mL tube (5540300, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) and spun down. After 24 h, the cell pellet will form ball-like micromass and transferred the medium into DMEM (SH30081, Hyclone, Logan, UT, USA) with 1 mM dexamethasone, 1% NEAA (M7145, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), 0.1% ITS+ (I2521, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), 50 μg/mL ascorbic acid, 40 μg/mL L-proline (P5607, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), 100 μg/mL sodium pyruvate (P5280, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), and 10 ng/mL TGF-β1 (T7039, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) contained. The micromass was cultured by shaking every other day to prevent adherence to the tube and culture for 21 days. Osteogenic, adipogenic differentiation, and chondrogenic micromass sections were detected by staining with Alizarin red S (A5533, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), Oil red O (O9755, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), and Alcian blue (B8438, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) / nuclear fast red (N3020, Sigma-Aldrich, Milan, Italy), respectively.

## 2.2. Flow Cytometry

To confirm the MSCs phenotype and to analyze the effect on the surface expression level of CXCR4 and CAR after TSA treatment, the MSCs were plated at 2 × 10<sup>5</sup> per 10-cm dish recovered for 24 h. The MSCs were treated with 100 ng/mL TSA for 24 h. After 24 h, the primed MSCs were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and were harvested with Accutase<sup>TM</sup> (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) and incubated with control rabbit IgG (eBioscience, San Diego, CA, USA), or polyclonal antibodies against human CXCR4 (1:50, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and CX3CR1 (1:100, Abcam, Cambridge, UK), CAR (1:100, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), CD29 (1:50, Ancell, Bayport, MN, USA), CD31 (1:50, Ancell, Bayport, MN, USA), CD34 (1:50, Ancell, Bayport, MN, USA), CD44 (1:50, BD PharMingen, San Diego, CA, USA), CD45 (1:20, eBioscience, San Diego, CA, USA), or CD105 (1:50, Ancell, Bayport, MN, USA), at 4 °C for 1 h. After the PBS wash, the cells were incubated with PE-conjugated, goat anti-rabbit IgG, at 4 °C for 30 min. The samples were then analyzed on a Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer and data analysis was performed using CellQuest Pro software v. 4.0.2 (BD Biosciences, Sydney, Australia).

## 2.3. In Vitro Migration Assay

HT29 human colorectal cancer cell line was plated onto 24-well plates at 1 × 10<sup>5</sup> cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 h before the migration assay was

performed. Hypoxic MSCs were treated with 100 ng/mL TSA for 24 h, then MSCs and hypoxic primed MSCs were seeded onto the 8  $\mu$ m pore-size cell culture inserts (Corning Inc., Corning, NY, USA), at 5000 cells per well, in DMEM supplemented with 10% FBS, and allowed to adhere for 1 h at 37 °C. The inserts were then added to the lower chambers with or without HT29 and incubated at 37 °C, with 5% CO<sub>2</sub>. After 14 h of migration, the medium was removed and cells that remained attached to the upper surface of the insert filters were removed, using cotton swabs. The cells that had migrated to the opposite side of the filters were stained with Fluoroshield™ with DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and counted under a fluorescent microscope at 100 $\times$  magnification. The average number of migrating cells per field was assessed by counting six random fields per filter.

#### 2.4. Adenovirus Infection

Hypoxic primed MSCs were trypsinized and counted the cell numbers, then infected with CRAdNTR (PS1217H6), kindly gifted by Dr. Ming-Jen Chen of Mackay Memorial Hospital, at a multiplication of infection (MOI) of 100 vp/cell, in serum free  $\alpha$ -MEM, for 1.5 h at 37 °C, and then an equal volume of growth medium (10% FBS) was added. After 24 h of infection, the medium was replaced with fresh culture medium, containing 10% FBS. CRAdNTR loaded-MSCs were indicated to MSC<sup>CRAdNTR</sup>. For investigation of adenoviral infection rate, CRAdeGFP was used in the same method to MSCs.

#### 2.5. Combination Cytotoxicity Assay

To determine the cytotoxic effect of CB1954 in combination with MSCs-delivered CRAdNTR, HT29 cells were plated in a 24-well plate at  $2 \times 10^6$  cells per well for 24 h. The hypoxic primed MSCs, MSC<sup>CRAdNTR</sup> for 48 h in a ratio of 1:10 and  $2 \times 10^8$  CRAdNTR (MOI = 100) were direct co-cultured with HT29 cells in presence of 50  $\mu$ L high titer human serum diluted in 2 mL DMEM per well of a 24-well plate. The mixed culture cells were incubated at 37 °C for 2 days. Then, cells were treated with 10  $\mu$ M CB1954 for 2 days, before the determination of cell viability using the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) and crystal violet staining. At different times during the culture, the medium was removed, the cells were washed once with PBS and 900  $\mu$ L of medium and 100  $\mu$ L of MTT solution (5 mg/mL) was added into each well and incubated at 37 °C for 4 h. At the end of incubation, the medium was aspirated and 200  $\mu$ L of DMSO was added to dissolve the dye. The absorbance at O.D.570 was measured using Tecan microplate reader (Infinite M1000, Tecan). The results were shown as the mean of three independent replicates  $\pm$  SD. The control wells without cells were used to account for the colorant retained by the culture plates. For crystal violet staining, the cells were fixed with 10% buffered formalin for 5 min and stained with 1% crystal violet, at room temperature for 20 min. Images of the plates were then captured with a scanner. The MTT assay and the crystal violet were performed in parallel.

#### 2.6. Genomic DNA Extraction

The excision of tissue and organs (20 mg) from a mouse including tumor, heart, liver, lung, and kidney were quickly minced and ground with micropestles. For adherent cells, the cells were trypsinized before harvesting. The cells were then centrifuged for 30 s at 13,000 $\times$  g, to discard the supernatant. The EasyPure Genomic DNA mini kit (Bioman Scientific Co., New Taipei City, Taiwan) was used to extract genomic DNA. Aliquots of 600  $\mu$ L cell lysis solution were added to the extracted sample. For tissue extraction, proteinase K (4 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the lysate and mixed by inverting 25 times and incubated at 55 °C for 3 h to overnight, until tissue particles have dissolved. For lysing the cells, pipetting up and down was made until no visible cell clumps remain, then 3  $\mu$ L of 20 mg/mL RNase A was added to the nuclear lysate and the sample was mixed by inverting the tubes 25 times and incubated for 15–30 min at 37 °C, followed by adding 200  $\mu$ L of Protein Precipitation solution to RNase-treated samples and vortexing vigorously at high speed for 20 s and centrifuging for 3 min at

13,000× g. The precipitated proteins formed a tight white pellet and the supernatant containing the DNA was transferred carefully to a clean 1.5 mL-tube containing 600 µL of room temperature isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the solution was gently mixed by inversion until white threadlike strands of DNA formed a visible mass and then the solution was centrifuged for 1 min at 13,000× g at room temperature. Then, using 600 µL 70% ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and interval several times to wash DNA. Finally, the DNA was rehydrated in the DNA rehydration solution by incubating at 65 °C for 1 h and the genomic DNA concentration was subsequently determined at OD 260/280 and OD 260/230. The genomic DNA was stored at 4 °C.

### 2.7. PCR

Expression of the adenoviral E1A gene was confirmed by PCR using forward E1A primer and as internal control (primer sequence are list on Table S1). The amplification was carried out in a total volume of 25 µL containing 500 ng genomic DNA, 0.4 µM of each primer, 200 µM dNTP (Takara Biochemicals, Otsu, Japan) 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche, Basel, Switzerland), 1U FastStart Taq polymerase (Roche, Basel, Switzerland), and 1× PCR reaction buffer (Roche, Basel, Switzerland). The entire mixture of 25 µL was subjected to 35 cycles of 1 min denaturation at 95 °C, 1 min to allow annealing at 63 °C, and 2 min of extension at 72 °C. During the last cycle, the extension time was increased by 7 min. During the last cycle, the extension time was increased by 7 min. Amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

### 2.8. Quantitative Real-Time PCR

The method of quantitative real-time RT-PCR was performed as described [26]. Total RNA (2 µg) of each sample reversely transcribed in 20 µL using 0.5 µg of oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 200U Superscript III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplification was carried out in a total volume of 20 µL, with SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), the cDNA and 500 nM of each primer. All of Primer sequences are list on Table S1. The reaction conditions were one cycle at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 56 °C for 15 s, and extension at 72 °C for 40 sec. Standard curves (cycle threshold values versus template concentration) were prepared for each target gene and for the endogenous reference (GAPDH) in each sample. The quantification of the unknown samples was performed by the ABI Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) with StepOne software v2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

### 2.9. Human Xenograft HT29 Colorectal Cancer Model

All experimental procedures involving animals were reviewed, approved, and conducted in accordance with established guidelines of the Animal Care and Use Committee at China Medical University. All efforts were also made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used according to the 3Rs principles (replacement, reduction, and refinement). To establish peritoneal colorectal cancer mice models, eight-week-old male athymic Balb/c mice were s.c. injected with  $1 \times 10^6$  HT29 colon carcinoma cells. After 14 days, the mice were randomly divided into three groups of 9 mice each and IV injected once with  $1 \times 10^6$  control primed MSCs (MSC), CRAdNTR-loaded primed MSCs (MSC<sup>CRAdNTR</sup>), or  $1 \times 10^9$  CRAdNTR suspended in the 1:10 diluted NAb-containing human serum (50 µL serum in 500 µL PBS). Two days later, all mice were i.p. administrated with 25 mg/kg CB1954 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 consecutive days per week for 2 cycles. After 14 days of last cycle of CB1954 administration, all mice were given third cycles of 25 mg/kg CB1954. The mice were sacrificed for harvest of tumor and vital organ tissues 7 days later. Tumors from all groups of mice were measured every week with calipers after treatment. The volume was estimated by the formula: volume = width<sup>2</sup> × length/2.

### 2.10. Immunohistochemistry

Resected xenograft tumor fixed in formalin, paraffin-embedded, and sectioned at 5  $\mu\text{m}$  thickness. Paraffin-embedded xenograft tumor sections were deparaffinized, rehydrated, and antigen retrieved by sodium citrate buffer pH 6.0 at 100 °C for 30 min. Endogenous peroxidase activity in tissue was blocked with 3% hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Residual enzymatic activity was removed by washing in PBS, and non-specific staining was blocked with Ultra V block (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) for 10 min and incubated with primary antibodies against adenovirus type 5 (1:800, Ad-5, rabbit polyclonal antibody, ab6982, Abcam, Cambridge, MA, USA) and NTR was detected using polyclonal sheep anti-NTR antibody—which was kindly provided by Dr. Chen, MJ, of Mackay Memorial Hospital, Taipei—at 4 °C overnight, washed extensively with PBS. After that, for primary Ad-5 antibody, the sections were incubated at room temperature with secondary polymeric antibody following the manufacturer's instruction (Super Sensitive™ IHC Detection Systems Kit, BioGenex, Milan, Italy). For primary NTR antibody, reacted with an HRP conjugated secondary rabbit anti-sheep antibody (1:5000, 31480, Thermo Scientific Pierce, USA) at room temperature for 1 h and followed by diaminobenzidine (DAB) staining (LSAB kit, Dako, Carpinteria, CA, USA). Finally, counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and observed with a microscope.

### 2.11. UPLC/MS-QTOF

#### 2.11.1. Sample Preparation

For samples containing FBS, 2 v methanol was added and the samples were held at  $-20$  °C to precipitate proteins. Then, centrifuged at 5000 rpm for 15 min and transferred the supernatant to clear tubes. For tissue sample, to extract the metabolites the 100 mg tissue, including heart, liver, lung, kidney, and xenograft tumor, were ground micropesles followed by adding 500 mL of 50% acetonitrile (ACN, JT-baker, Deventer, Holland), then, homogenized by using microtube homogenizer (BeadBug™, Benchmark, Edison, NJ, USA), the homogenous samples were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, harvested the supernatant and transferred to clear tubes. To remove matrix effect, samples were cleaned-up by off-line solid-phase extraction (SPE) using Oasis HLB™ Cartridge 1 cc (30 mg) (Waters, Wexford, Ireland). The SPE cartridges were conditioned with 1.0 mL methanol followed by 1.0 mL water Milli-Q and the samples were loaded in the cartridge. Then, cartridges were washed with 1 mL of 5% (*v/v*) methanol in water Milli-Q. The analytes were eluted by 1 mL absolute methanol. The elution was under a stream of nitrogen. The extracted sample was reconstituted with 100  $\mu\text{L}$  absolute methanol and transferred to an injection vial or store at  $-20$  °C.

#### 2.11.2. Chromatographic System

The chromatographic system consisted of Waters ACQUITY UPLC were equipped with a spectrophotometric with Waters Synapt G1 high-definition mass spectrometer. CB1954 and metabolite separation was performed at 30.0 °C on an analytical ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm  $\times$  2.1 mm I.D.) with a particle size of 1.7  $\mu\text{M}$  (Waters). The compounds of interest were analyzed by electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-QTOF MS). The SYNAPT G1 mass spectrometer was used in V mode and operated in electrospray ionization positive mode with a capillary voltage of 3.0 kV, the sampling cone at 40 V and the extraction cone at 4.0 V. The scan time was 0.2 s covering the range of 50 to 320 Da mass range. The source temperature was 80 °C and the desolvation temperature was set at 250 °C. Nitrogen gas was used as the nebulization gas at a flow rate of 500 L/h. The trap collision energy was set at 6.0 V while the transfer optics collision energy was set to 4.0 V. The MassLynx software (Waters) was used to pilot the ACQUITY UPLC instrument and to process the data (i.e., plotting of chromatograms) throughout the method validation and sample analysis.

### 2.11.3. Mobile Phase Solutions

The mobile phase is composed of solution A (2% Acetonitrile/H<sub>2</sub>O + 0.1% Formic acid) and B (100% Acetonitrile + 0.1% Formic acid). Both solutions were degassed by separating with helium. The injection volume was 10 µL. The mobile phase was delivered at 1.0 mL/min. The gradient program conditions are reported in Table S2.

### 2.12. Pharmacokinetics of CRAdNTR in Venous Blood

An aliquot of 100 µL of  $2 \times 10^8$  CRAdNTR particles with the 1:10 diluted NAb was infused into the right retro-orbital sinus of three mice. Tail blood samples at 10, 30, 90, 180, and 360 min following the CRAdNTR virus infusion were used for pharmacokinetic studies. The genomes of virus per 50 µL of blood were extracted by DNeasy Blood and Tissue kits (QIAGEN, Germantown, MD, USA) and determined by quantitative-PCR. For quantification, a standard curve was constructed by assaying serial dilutions of CRAdNTR virus ranging from  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^3$  vp/mL. The correlation coefficient of the standard curve was 0.9982.

### 2.13. Statistical Analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  SD. Analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test were used for statistical comparisons in groups greater than and equal to two, respectively (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A value of  $p < 0.05$  is considered to be statistically significant.

## 3. Results

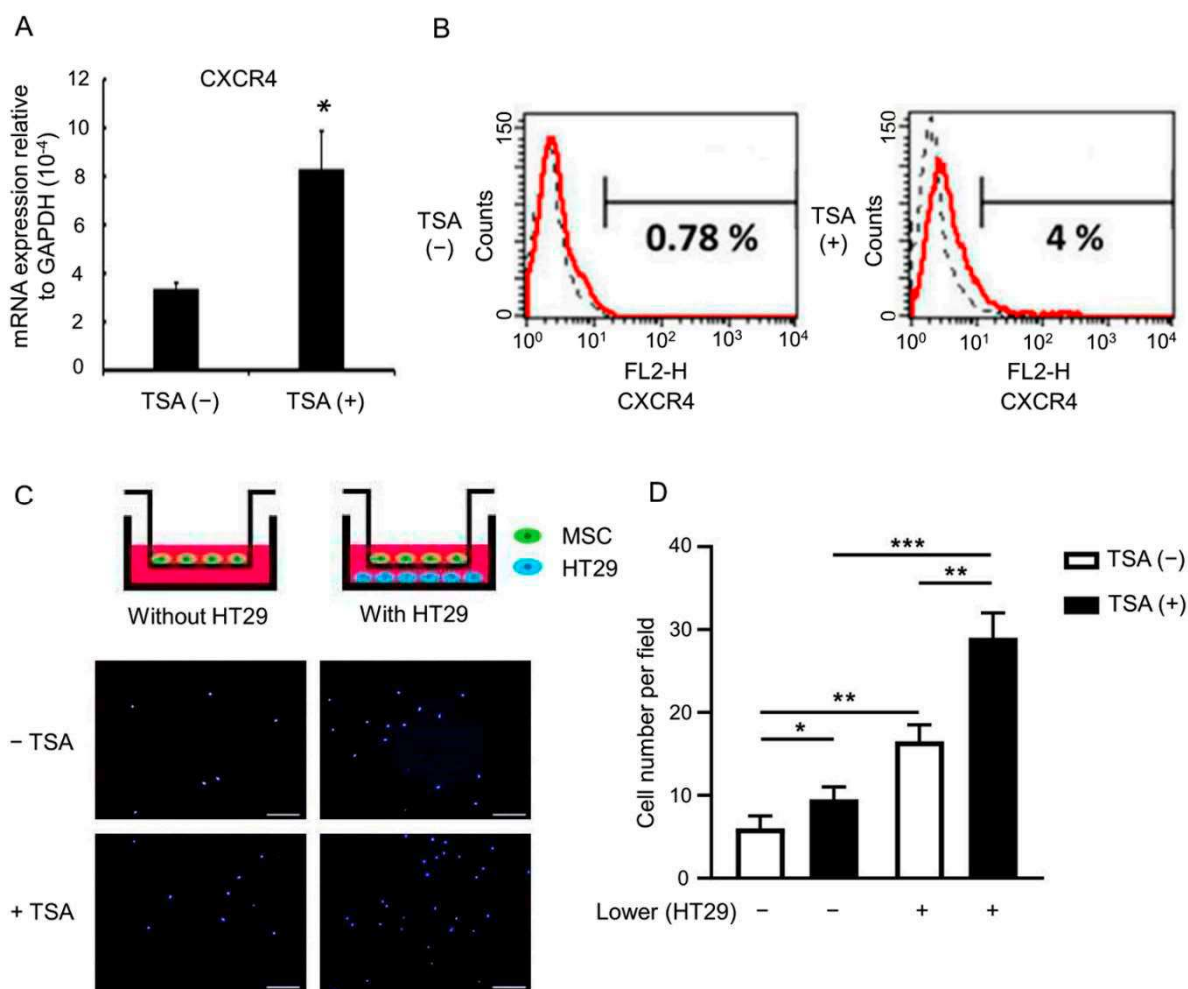
### 3.1. Trichostatin A (TSA)-Primed MSCs Have a Normal MSC Surface Phenotype

TSA is known to upregulate chemokine receptors, such as CXCR4 [27], and increase CAR expression on bladder cancer cells [28] although its effects on MSCs are unknown. We first demonstrated that TSA at a concentration greater than 150 ng/mL induced cytotoxicity in hypoxic MSCs, as evidenced by crystal violet staining (Supplementary Figure S1A) and the MTT assay (Supplementary Figure S1B). Therefore, we used a concentration of 100 ng/mL to prime MSCs for 24 h. TSA-primed MSCs showed no difference with control MSCs in morphology (Supplementary Figure S2A), proliferation capacity (Supplementary Figure S2B), and differentiation potentials (Supplementary Figure S2C–E). Moreover, TSA-primed MSCs highly expressed CD29, CD44, and CD105, which are the most commonly reported positive surface markers of MSCs, but did not express the most frequently reported negative surface markers, such as CD31, CD34, and CD45 (Supplementary Figure S2F). More importantly, TSA-primed MSCs did not express a senescence marker (Supplementary Figure S2G). These results together suggest that MSCs primed with TSA have a normal MSC phenotype.

### 3.2. TSA Enhances MSC Tumor Tropism

Since only a small portion of MSCs reach the tumor sites after systemic administration [29,30], optimization of MSC tumor tropism is important for using MSCs to deliver oncolytic virus in the context of various tumor models. CXCR4 is a chemokine receptor responsible for MSC tumor tropism [31]. A previous study showed that histone deacetylase inhibitors (HDACi) increase CXCR4 expression in hematopoietic stem/progenitor cells [32]. We therefore asked whether TSA could increase CXCR4 expression on MSCs. Quantitative RT-PCR and flow cytometry revealed that primed MSCs had significantly upregulated CXCR4 mRNA (Figure 1A) and surface protein levels (Figure 1B). In addition, primed MSCs also showed improved migration ability and cancer cell tropism, e.g., when employing the HT29 human colorectal cancer cell line (Figure 1C,D). These data suggest that TSA treatment can be used to upregulate CXCR4 expression, as well as to enhance tumor tropism in MSCs.

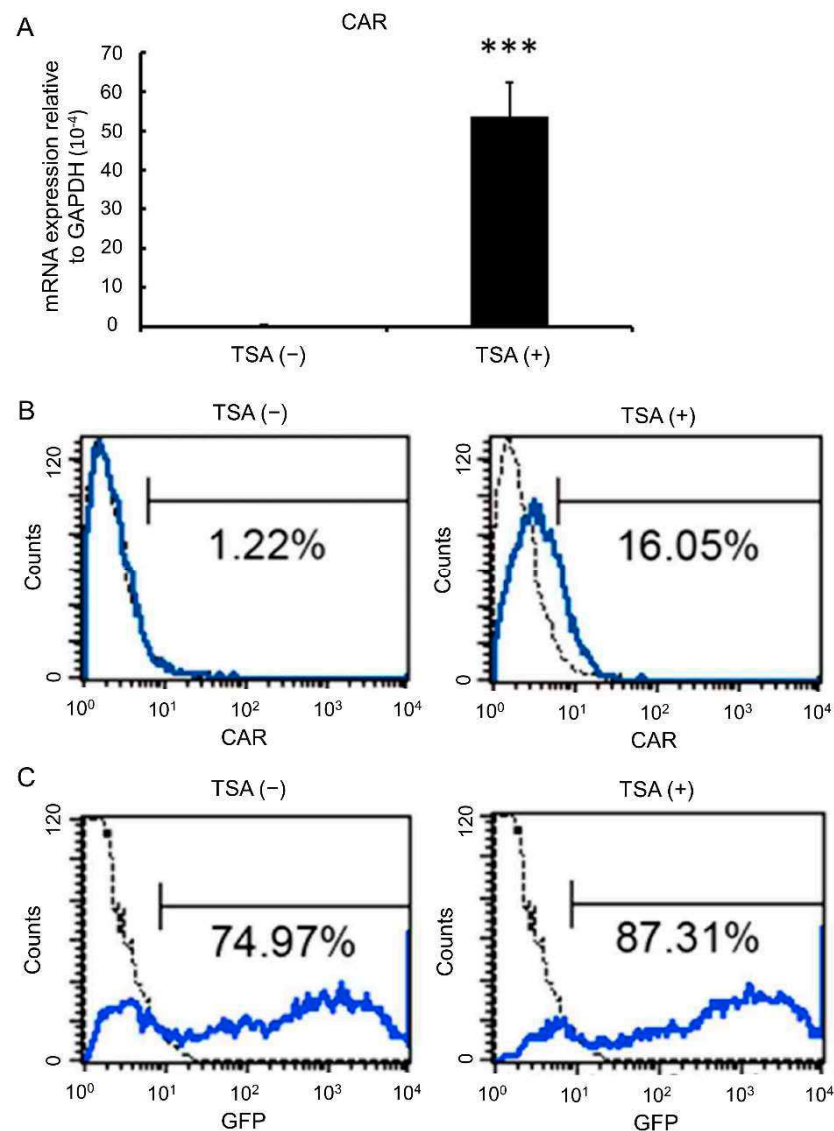




**Figure 1.** TSA enhances the expression of CXCR4 and the capacity for migration to tumor. MSCs treated without or with 100 ng/mL of TSA treatment for 24 h were analyzed for the expression of CXCR4 using (A) quantitative RT-PCR and (B) flow cytometry. The results of quantitative RT-PCR are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (C,D) In vitro migration abilities of MSCs treated without or with TSA in the absence of presence of HT29 were determined using transwell migration wells. (C) The representative photomicrographs showing DAPI-stained cells that migrated to the opposite side of the filter. (D) The average numbers of migrating cells per field were assessed by counting four random fields per filter. The quantification results are shown as mean  $\pm$  SD. Asterisks indicate significant differences as determined by the One-Way ANOVA (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus MSCs untreated with TSA). Scale bar, 200  $\mu$ m.

### 3.3. TSA Enhances CAR Expression and Adenovirus Infection Rates

TSA has been reported to increase CAR expression on bladder cancer cells [28]. We then asked whether TSA had a similar effect on MSCs. Both quantitative RT-PCR (Figure 2A) and flow cytometry (Figure 2B) showed that surface expression of CAR was significantly upregulated in MSCs after TSA treatment. When evaluating the viral loading capacity of MSCs via CRAdEGFP infection followed by analysis of EGFP fluorescence intensities, we found that primed MSCs also featured increased viral loading (Figure 2C). These data suggest that TSA treatment increases CAR expression, as well as the susceptibility to adenoviral infection of MSCs.

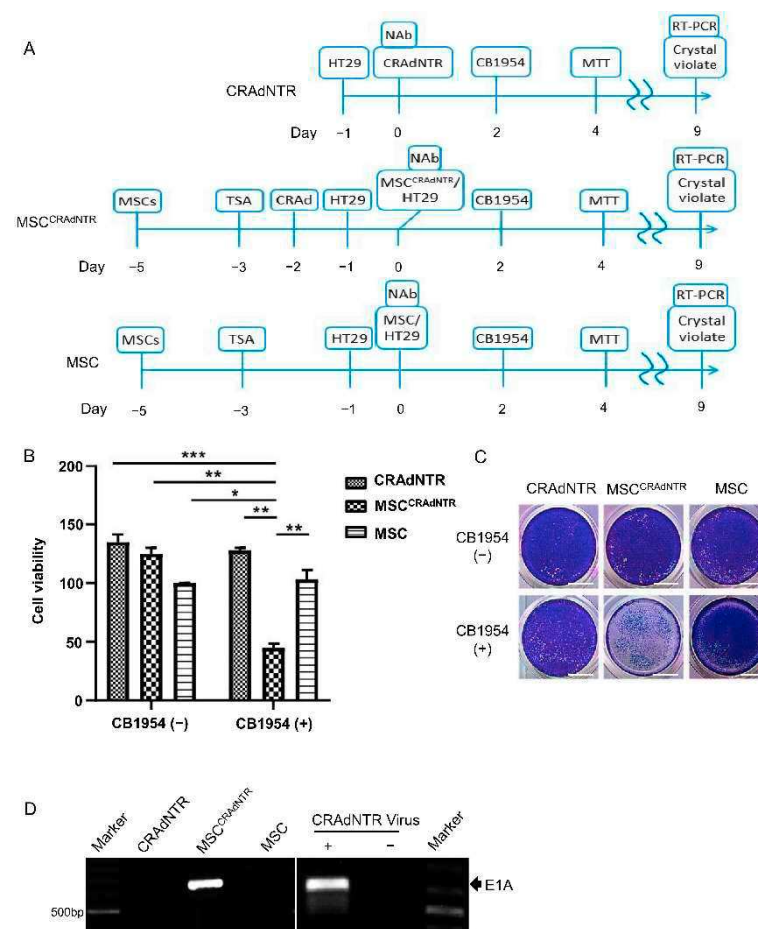


**Figure 2.** TSA enhances CAR expression and adenoviral infection rate. MSCs treated without or with 100 ng/mL of TSA treatment for 24 h were analyzed for the expression of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) using (A) quantitative RT-PCR and (B) flow cytometry. The results of quantitative RT-PCR are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (C) These cells were also subjected to comparison of adenoviral infection rates using CRAdeGFP to infect these cells and analyzing the GFP expression by flow cytometry. Asterisk indicates a significant difference as determined by the Student's *t* test (\*\*\*)  $p < 0.001$  versus MSCs untreated with TSA).

### 3.4. Combination of MSC-Delivered CRAdeNTR with a Prodrug Induces Cytotoxicity in Colorectal Cancer Cells in the Presence of NAb In Vitro

Since preexisting neutralizing antibodies (NAb) in the circulation represent a major obstacle of oncolytic viral therapy upon clinical application, we performed all subsequent experiments in the presence of NAb to mimic conditions reflecting those in clinical practice. To reduce the cytotoxic effects of oncolytic viral therapy on normal host tissues or cells, we investigated the cytotoxic effects on three p53-deficient colorectal cancer cell line, including HT29, SW480, and SW620 [33], through the combination of prodrug activation and MSC-delivered CRAdeNTR both in vitro and in vivo. The corresponding experimental procedures are shown in Figure 3A. The data revealed that CRAdeNTR alone, blocked by NAb, did not cause cytotoxicity in HT29 cells either with or without CB1954 treatment, suggesting that CRAdeNTR did not infect HT29 cells and that CB1954 was not activated. Interestingly,

when primed MSCs loaded with CRAdNTR ( $MSC^{CRAdNTR}$ ) were added to HT29 cells, cytotoxicity was only observed in the presence of CB1954, as evidenced by a significant decrease in crystal violet staining (Figure 3B) and the MTT assay (Figure 3C). Notably, co-culture of primed MSCs did not induce any decrease in crystal violet staining or the MTT assay, both in the absence or presence of CB1954, suggesting that primed MSCs alone did not induce cytotoxicity in HT29 cells (Figure 3B,C). Similar results were observed in SW480 and SW620, where significant cytotoxicity was only observed when  $MSC^{CRAdNTR}$  were added to these cells in the presence of CB1954 (Supplementary Figure S3). Furthermore, quantitative RT-PCR for adenoviral E1A confirmed that CRAdNTR, carried by  $MSC^{CRAdNTR}$  cells, was delivered into HT29 cells in the presence of NAb (Figure 3D). These results suggest that  $MSC^{CRAdNTR}$  successfully protected CRAdNTR from NAb neutralization and could deliver the viruses to colorectal cancer cells. Moreover, the combination of MSC delivery and prodrug CB1954 activation potentially enhanced the in vitro cancer-killing efficacy of CRAdNTR in the presence of NAb.



**Figure 3.** Combination of MSCs-delivered CRAdNTR with prodrug induces cytotoxicity in colorectal cancer cells in the presence of NAb in vitro. **(A)** Flow chart of the in vitro study design. **(B–D)** CRAdNTR, MSCs pretreated with 100 ng/mL TSA for 24 h, followed by loading with CRAdNTR ( $MSC^{CRAdNTR}$ ), or MSCs pretreated with TSA alone (MSC) were seeded into wells pre-seeded with HT29. The cell cultures were treated with anti-Adv neutralization antibodies (NAb) and CB1954 at indicated time. Aliquot of cells were subjected to **(B)** MTT assays, **(C)** crystal violet staining, and **(D Left)** RT-PCR detection of the adenoviral E1A gene (675bp) at indicated time. **(D Right)** HT29 treated with and without CRAdNTR virus were used as positive and negative control, respectively. Asterisk indicates a significant difference as determined by One-Way ANOVA (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus other groups). Scale bar: 50 mm in **(C)**.

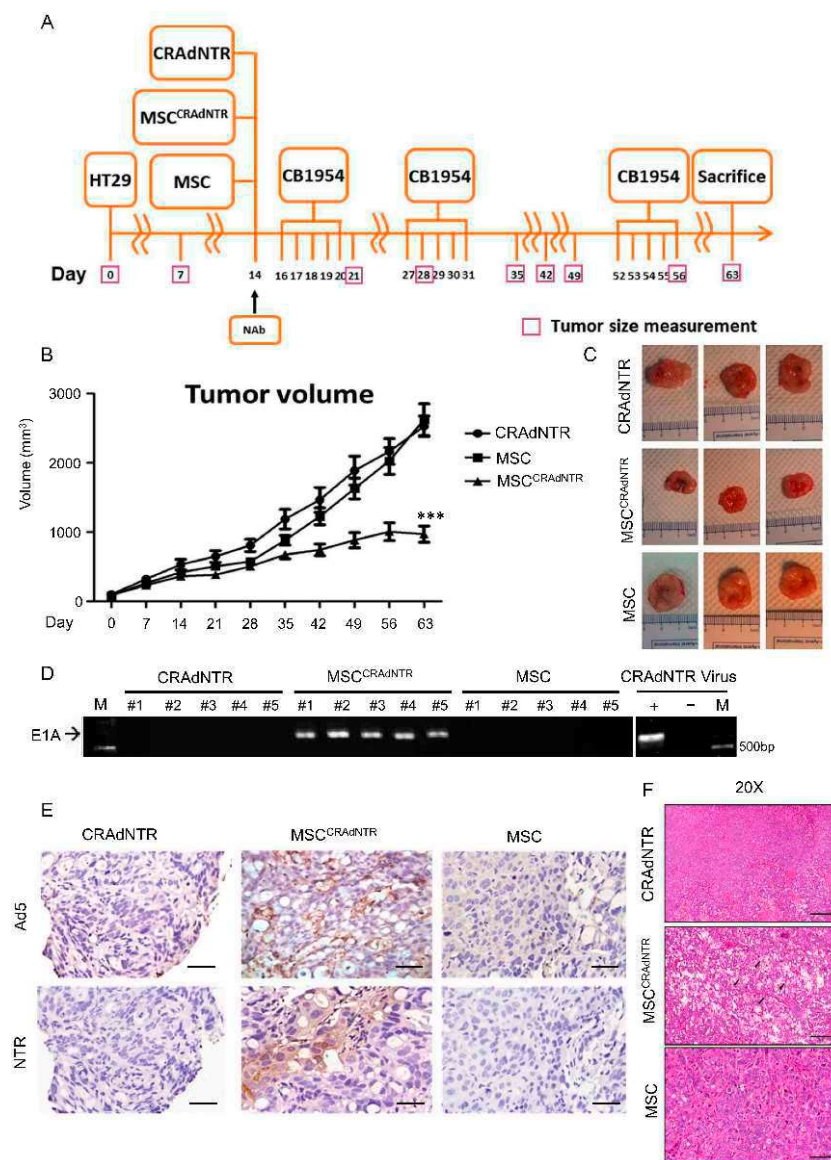
### 3.5. MSC-Delivered CRAAdNTR Combined with a Prodrug Reduces Colorectal Cancer Growth in the Presence of NAb In Vivo

To determine the in vivo cancer-killing effect of CRAAdNTR via the combination of MSC delivery and prodrug CB1954 activation in the presence of NAb, the experimental design shown in Figure 4A was employed, where CRAAdNTR alone, MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, and primed MSCs were intravenously injected into tumor-bearing immunodeficient mice. The mice also received CB1954 via i.p. injection every five consecutive days per week at a dosage of 25 mg per kilogram for two cycles (weeks). Tumor growth curves revealed that tumor growth in mice receiving MSC<sup>CRAAdNTR</sup> was significantly abrogated compared to the other two groups that received CRAAdNTR or primed MSCs (Figure 4B,C). In addition, to investigate the durability of activated oncolytic adenovirus after inoculation in vivo, CB1954 injection was delayed by about 20 days after the second cycle of CB1954 treatment before the third cycle was initiated. Delayed CB1954 injection also significantly inhibited the increase in tumor volume in the MSC<sup>CRAAdNTR</sup> group at approximately day 50, while the tumors in the other two groups continued to grow. These results suggest that oncolytic adenovirus is a powerful agent that possesses a long-lasting replication activity to induce the cytolytic effect, which might enhance its therapeutic efficacy.

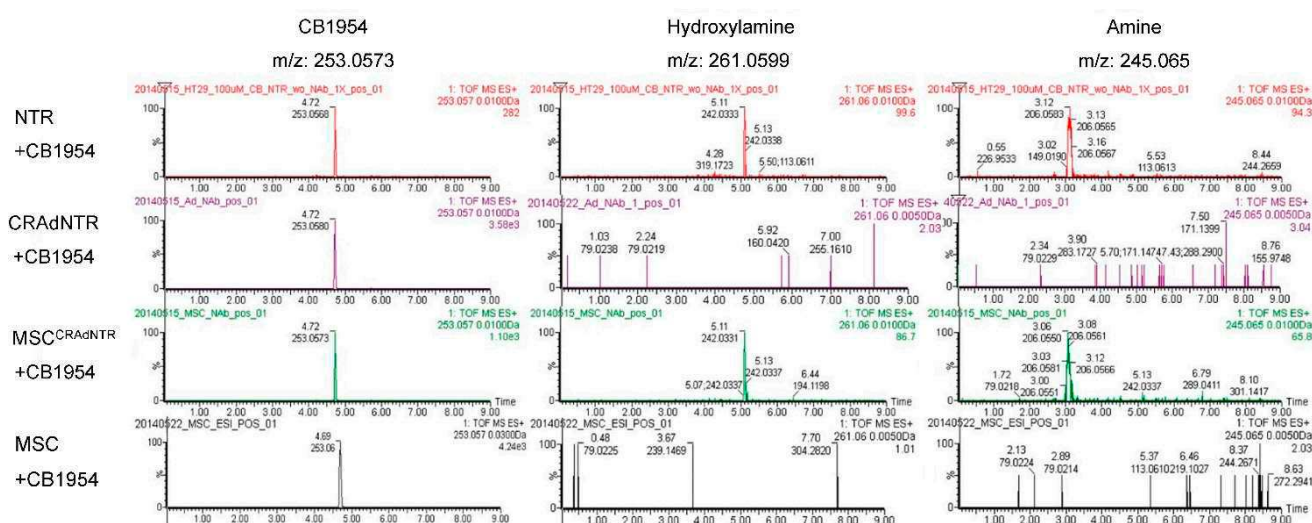
To examine whether oncolytic adenoviruses were successfully transported into solid tumor sites via MSC delivery, xenografted tumors were excised for genomic DNA extraction 9 weeks later, followed by analysis of adenoviral gene expression. As expected, the adenoviral E1A gene was detected in the tumor grafts of mice receiving MSC<sup>CRAAdNTR</sup> ( $n = 5$ ), but not in tumor grafts of mice receiving CRAAdNTR or primed MSCs (Figure 4D). In contrast, the viral genome was only detected in plasma within a few hours after intravenous injection and could not be detected 6 h after infusion (Figure S4). Immunohistochemistry further showed that tumors treated with MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, but not those treated with CRAAdNTR or primed MSCs, were positive for NTR and Ad5, the adenoviral capsid protein (Figure 4E). Furthermore, hematoxylin and eosin (H&E) staining revealed a significant increase in necrotic areas in MSC<sup>CRAAdNTR</sup>-treated tumor sections compared to those of mice that received CRAAdNTR or primed MSCs (Figure 4F), suggesting that the combination of CB1954 activation with MSC-delivered CRAAdNTR effectively lysed tumors, and generated areas containing lytic cells. These results suggest that MSCs act as carriers to successfully protect CRAAdNTR from Nab-mediated neutralization, and transfer the virus to the tumor site, where it replicates and lyses tumor cells. The combination of the gene suicide system NTR/CB1954 caused cytolytic effects to reduce colorectal cancer growth in vivo.

### 3.6. MSC-Delivered CRAAdNTR Combined with a Prodrug Induces Cytotoxicity in Colorectal Cancer Cells In Vitro via the Generation of Cytotoxic Metabolites

*Escherichia coli* NTR has been described to convert CB1954 into cytotoxic metabolites, like 2-hydroxylamine, 4-hydroxylamine, 2-amine, and 4-amine [34]. To confirm this, metabolites present in the extracellular medium of in vitro cultures were deproteinized, concentrated, and analyzed by UPLC-MS/QTOF. The mass spectra gave prominent parent molecular ions at the expected  $m/z$  values: CB1954 ( $[M + H]^+ = 253.057$ ), 2-hydroxylamine and 4-hydroxylamine ( $[M + Na]^+ = 261.0599$ ), and 2-amine and 4-amine, ( $[M + Na]^+ = 245.065$ ). The metabolites of interest were identified by comparing the retention times with those of the standards, which are the products of CB1954 (retention time: 4.7 min) reacted with exogenous *Escherichia coli* NTR enzyme. The metabolites hydroxylamine and amine had retention times of 5.1 and 3.1 min, respectively, as illustrated by the extracted-ion chromatogram in Figure 5. These results indicated that the metabolites from HT29 cells treated with MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, as well as with CB1954, were detected at retention times of 5.1 and 3.1 min. Furthermore, we could show that the conversion of CB1954 was incomplete. However, metabolites were not found in HT29 cells treated with CRAAdNTR or primed MSCs in combination with CB1954. These data suggest that the in vitro cytotoxic effects on colorectal cancer cells were caused by the production of cytotoxic metabolites from the prodrug CB1954.



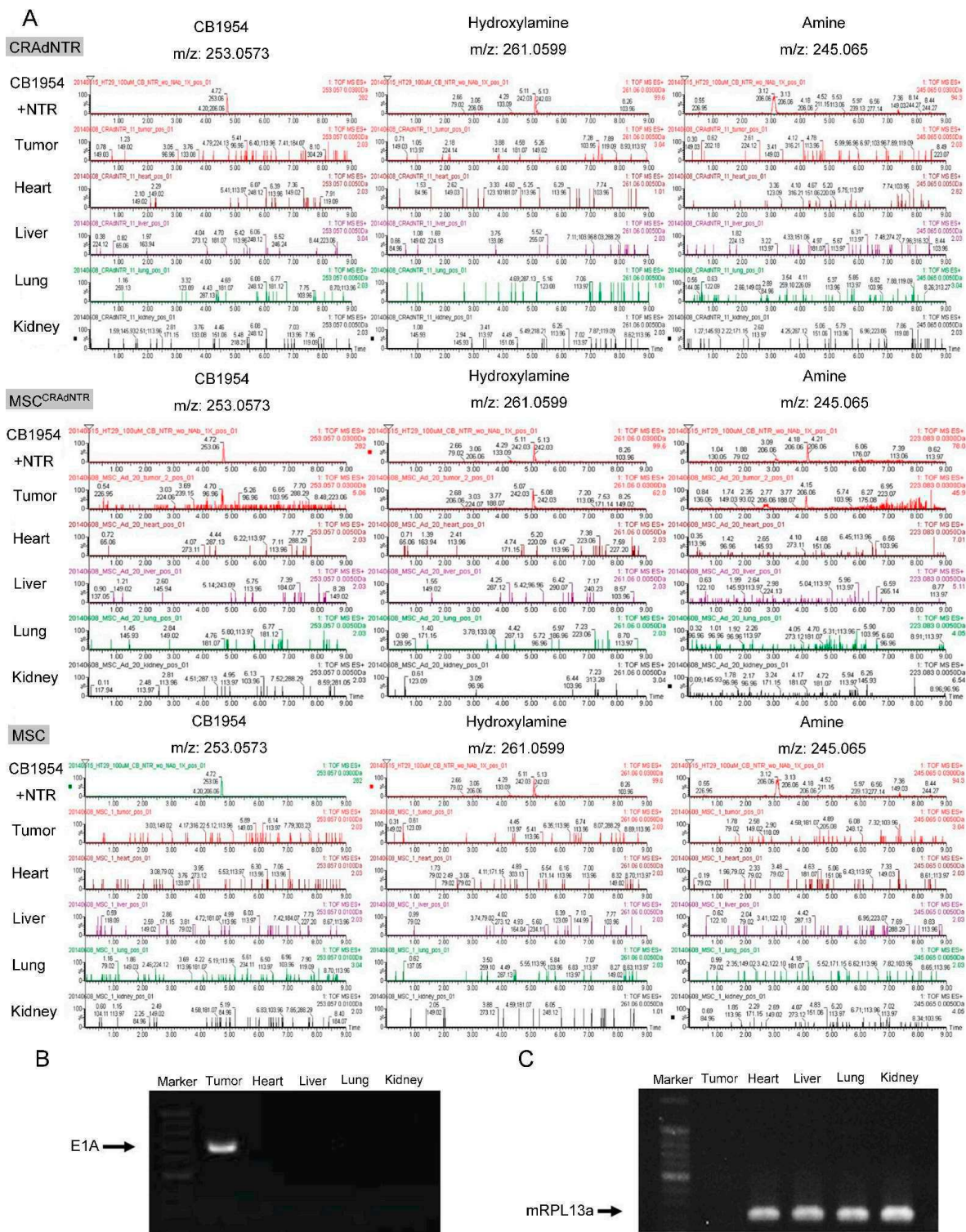
**Figure 4.** MSCs-delivered CRAdNTR combined with prodrug reduces colorectal cancer growth in the presence of NAb in vivo. **(A)** Flow chart of the animal study design. **(B–F)** CRAdNTR, MSCs pretreated with 100 ng/mL TSA for 24 h, followed by loading with CRAdNTR (MSC<sup>CRAdNTR</sup>), or MSCs pretreated with TSA alone (MSC) were IV co-infused with anti-Adv neutralization antibodies (NAb) into mice bearing HT29 tumors established 14 days ago. The mice were i.p. injected with CB1954 at indicated times. **(A)** Tumor volumes were measured every week, and the mice were sacrificed and tumors were harvested for analysis. **(C)** Representative macroscopic images of solid tumors. **(D** Left) RT-PCR detection of the adenoviral E1A gene (675 bp), **(D** Right) HT29 treated with and without CRAdNTR virus were used as positive and negative control, respectively. **(E)** IHC detection of Ad5, capsid proteins of adenovirus type 5, and NTR in serial sections, and **(F)** H&E staining for histological analysis. Arrows indicate tumor lysis areas. Asterisk indicates a significant difference as determined by One-Way ANOVA (\*\**p* < 0.001 versus other groups). Scale bar: 1 mm (the minimal scale) in **(C)**; 50  $\mu$ m in **(E)**; 100  $\mu$ m in **(F)**.



**Figure 5.** Detection of cytotoxic metabolites of CB1954 in the conditioned medium of HT29 cells. Flow chart of the in vitro study design is the same as Figure 3A. The conditioned medium of HT29 cells treated with CRAAdNTR, MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, or MSC alone, followed by treatment with anti-Adv neutralization antibodies (NAb) and CB1954, were analyzed by UPLC/MS-QTOF. NTR+CB1954 solution referred to as standard metabolites of the reaction of CB1954 with exogenous NTR is showed in upper panel. CB1954 were protonated molecule  $[M + H]^+$  at  $m/z$  253.0573. However, hydroxylamine and amine have been ionized by the addition of a sodium cation  $[M + Na]^+$  at  $m/z$  261.0599 and 245.0645, respectively. CB1954, hydroxylamine and amine exhibited peaks at retention times 4.7, 5.1, and 3.1 min in the extracted ion chromatogram. The results show that only the conditioned medium from CB1954 treated to MSC<sup>CRAAdNTR</sup> which co-cultured with HT29 cells exhibited peaks of hydroxylamine and amine.

### 3.7. Cytotoxic Metabolites from CB1954 Specifically Exist in the Tumor Area Rather than in Other Vital Organs

We further demonstrated that toxic metabolites were only detected in tumors of mice receiving MSC<sup>CRAAdNTR</sup>, but not in tumors of mice receiving CRAAdNTR or primed MSCs in combination with CB1954 treatment (Figure 6A). Notably, the safety issues regarding the use of oncolytic viruses for cancer treatment are well recognized [35]. Although CRAAdNTR carried by MSCs was successfully delivered to tumor sites, it was uncertain whether it would also be transferred to vital organs, causing unexpected toxicity. It was revealed that the cytotoxic metabolites, hydroxylamine, and amine, which had single peak profiles, were detectable only in the tumors of MSC<sup>CRAAdNTR</sup>-treated mice, but not in other organs, such as the hearts, livers, lungs, and kidneys of these mice (Figure 6A). Metabolites of CB1954 were also not detected in solid tumors and vital organs of mice receiving CRAAdNTR and primed MSCs (Figure 6A). Similarly, the adenoviral E1A gene was specifically detected in xenografted tumors, but not in other organs of mice that had received MSC<sup>CRAAdNTR</sup> (Figure 6B), which expressed an internal control, mRPL13a, a murine housekeeping gene (Figure 6C). These results provide evidence in support of the safety of our therapeutic strategy, without causing toxicity to vital organs, since MSC<sup>CRAAdNTR</sup> specifically homed to tumor sites, while the tumor lysis effect was caused by cytotoxic metabolites generated from the prodrug CB1954.



**Figure 6.** Cytotoxic metabolites of CB1954 were produced only in tumor of MSC<sup>CRAdNTR</sup> treated mice. Flow chart of the animal study design is the same as Figure 4A. (A) Mice bearing HT29 tumors IV infused with CRAdNTR, MSC<sup>CRAdNTR</sup>, or MSC alone, followed by treatment with anti-Adv neutralization antibodies (NAb) and CB1954. The mice were sacrificed for harvest of tumor and vital organ tissues. (A) The extracts were analyzed by UPLC/MS-QTOF. NTR+CB1954 solution referred to as standard metabolites of the reaction of CB1954 with exogenous NTR is shown in upper panel. Retention times of CB1954 (4.7 min), hydroxylamine (5.1 min), and amine (3.1 min) are shown in the extracted ion chromatograms of “CB1954+NTR”. RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis for the expression of (B) adenoviral E1A gene (675bp) and (C) mRPL13a, a mouse housekeeping gene. “M” represented as marker.

#### 4. Discussion

Epigenetic modification with HDACi is a new method to induce certain characteristics of MSCs for clinical applications, which may cause major changes in the transcriptome. A comprehensive transcriptome analysis using high-throughput sequencing of pig bone-marrow derived MSCs, both treated and untreated with TSA for 24 h, revealed that TSA does not affect the expression of surface markers that are currently used to define MSCs [36], such as CD90 (positive marker), CD31, and CD34 (negative markers), and has a higher effect on already expressed genes, while its ability to induce silent gene expression is less [37]. These data suggest MSCs primed with TSA still retain some of the original characteristics of MSCs. TSA affects the expression of genes related to a variety of biological processes, and up-regulates genes involved in development, differentiation, neurogenesis, myogenesis, Wnt signaling pathways [37], and pluripotency [38]. Since current research has not used MSC for regenerative medicine purposes involving proliferation and differentiation potential, the changes in gene expression caused by TSA will not have much impact on its use as a cell carrier for oncolytic viruses.

In the current study, TSA not only increased the CXCR4 level and migration ability of primed MSCs towards cancer cells without affecting MSC viability and phenotype, but also resulted in elevated CAR receptor expression on primed MSCs to promote the adenovirus infection rate, thereby enhancing the capacity of CRAdNTR loading. We further demonstrated that an oncolytic adenovirus combined with a prodrug is a powerful tool in cancer therapy, with the ability to convert CB1954 into potentially cytotoxic metabolites by reacting with the NTR enzyme of CRAdNTR, causing tumor lysis and reduction of colorectal cancer growth, while side effects are minimized by avoiding toxicity for vital organs.

Since NTR/CB1954 holds the potential for use in cancer gene therapy, 4-hydroxylamine is the major cytotoxic metabolite, and 2-amine is the main bystander metabolite with better diffusion ability in cellular multilayers [34]. According to our newly obtained data, metabolites could be successfully generated from CB1954 based on the detection of its  $m/z$  ratio. However, 2-hydroxylamine and 4-hydroxylamine, as well as 2-amine and 4-amine are isomers with the same molecular formulas and weights, but with different chemical structures and functional groups. Therefore, even if we try to distinguish them by tandem mass spectrometry, they cannot be well distinguished (data not shown).

Since these metabolites are very rare, making it difficult to purchase a standard for each metabolite from commercial suppliers, it may not be possible to directly determine which peak belongs to which isomer by simply comparing the retention time with that of the standard. To determine which isoform of each metabolite is produced from CB1954 in colorectal cancer, it will be necessary to elute and determine the retention times of the metabolites by UPLC/MS-QTOF, followed by purification and analysis of their configuration by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

There are limitations to the current study that warrant discussion. For example, it has not been shown that TSA-primed MSCs increased *in vivo* tumor tropism in comparison with non-primed control MSCs. This can be improved by *in vivo* experiment using imaging to demonstrate whether this priming attracts more MSCs to the tumors. However, there is a large amount of evidence showing that increased CXCR4 expression on cell surface can promote tumor tropism *in vivo* [31,39,40], and efforts were also made in the current study to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. These are the reasons why we did not conduct these animal experiments. However, the transwell migration assay, an alternative *in vitro* assay, also proved TSA-primed MSCs increased tumor tropism. Together, these data indicate that MSCs primed by TSA not only increase CXCR4 expression, but also enhance tumor tropism *in vitro*.

As MSCs have been shown to possess the ability to home to metastatic cancers [41], our strategy of combining MSCs carrying oncolytic adenovirus with GDEPT holds potential and provides superiority with regard to cancer gene therapy. Recent studies have demonstrated the potential of oncolytic viruses carrying genes encoding immune-modulating molecules to combine immune checkpoint blockades for cancer therapy [42,43] thus, combination of



TSA-primed MSCs with GDEPT is a promising approach for combining immune checkpoint blockades for treatment of metastatic cancers.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9050548/s1>, Figure S1, Figure S2, Figure S3, Figure S4.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.-C.H.; methodology, S.-C.H., C.-T.H.; M.-H.W.; M.-J.C.; S.-P.L. and Y.-T.Y.; validation, S.-C.H., C.-T.H. and M.-H.W.; investigation, S.-C.H. and C.-T.H.; resources, M.-J.C. and S.-P.L.; data curation, C.-T.H. and M.-H.W.; writing—original draft preparation, C.-T.H. and M.-H.W.; writing—review and editing, S.-C.H.; visualization, C.-T.H.; supervision, S.-C.H.; project administration, S.-C.H.; funding acquisition, M.-J.C. and S.-P.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by the Minister of Science and Technology (MOST 106-2321-B-039 -003) and China Medical University Hospital (Grant No. DMR-110-228). The funding sources had no involvement in study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Acknowledgments:** This work was supported by the “Drug Development Center, China Medical University” from The Featured Areas Research Center Program within the framework of the Higher Education Sprout Project by the Ministry of Education (MOE) in Taiwan.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

Ad-5	Adenovirus type 5
CRAd	Conditionally replicative adenovirus
FBS	Fetal bovine serum
GDEPT	Gene-directed enzyme-prodrug therapy
i.p.	Intraperitoneal
MSC	Mesenchymal stem cell
NAb	Neutralized antibody
NTR	Nitroreductase
s.c.	Subcutaneous
SPE	Solid-phase extraction
TSA	Trichostatin A
qTOF	Quadrupole-time-of-flight

## References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)]
2. Russell, S.J.; Peng, K.W.; Bell, J.C. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 658–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lin, E.; Nemunaitis, J. Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther.* **2004**, *11*, 643–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jiang, H.; Gomez-Manzano, C.; Lang, F.F.; Alemany, R.; Fueyo, J. Oncolytic adenovirus: Preclinical and clinical studies in patients with human malignant gliomas. *Curr. Gene Ther.* **2009**, *9*, 422–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bergelson, J.M.; Cunningham, J.A.; Droguett, G.; Kurt-Jones, E.A.; Krithivas, A.; Hong, J.S.; Horwitz, M.S.; Crowell, R.L.; Finberg, R.W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **1997**, *275*, 1320–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hung, S.C.; Lu, C.Y.; Shyue, S.K.; Liu, H.C.; Ho, L.L. Lineage differentiation-associated loss of adenoviral susceptibility and Coxsackie-adenovirus receptor expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2004**, *22*, 1321–1329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kim, K.H.; Dmitriev, I.; O'Malley, J.P.; Wang, M.; Saddekni, S.; You, Z.; Preuss, M.A.; Harris, R.D.; Aurigemma, R.; Siegal, G.P.; et al. A phase I clinical trial of Ad5.SSTR/TK.RGD, a novel infectivity-enhanced bicistronic adenovirus, in patients with recurrent gynecologic cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 3440–3451. [[CrossRef](#)]

8. Kim, D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: What have we learned? *Gene Ther.* **2001**, *8*, 89–98. [[CrossRef](#)]
9. Ries, S.J.; Brandts, C.H.; Chung, A.S.; Biederer, C.H.; Hann, B.C.; Lipner, E.M.; McCormick, F.; Korn, W.M. Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1128–1133. [[CrossRef](#)]
10. Bischoff, J.R.; Kim, D.H.; Williams, A.; Heise, C.; Horn, S.; Muna, M.; Ng, L.; Nye, J.A.; Sampson-Johannes, A.; Fattaey, A.; et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **1996**, *274*, 373–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Huebner, R.J.; Rowe, W.P.; Schatten, W.E.; Smith, R.R.; Thomas, L.B. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* **1956**, *9*, 1211–1218. [[PubMed](#)]
12. Wong, H.H.; Lemoine, N.R.; Wang, Y. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. *Viruses* **2010**, *2*, 78–106. [[CrossRef](#)]
13. Hung, S.-C.; Deng, W.-P.; Yang, W.K.; Liu, R.-S.; Lee, C.-C.; Su, T.-C.; Lin, R.-J.; Yang, D.-M.; Chang, C.-W.; Chen, W.-H.; et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 7749–7756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Klauzinska, M.; Castro, N.P.; Rangel, M.C.; Spike, B.T.; Gray, P.C.; Bertolette, D.; Cuttitta, F.; Salomon, D. The multifaceted role of the embryonic gene Cripto-1 in cancer, stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *29*, 51–58. [[CrossRef](#)]
15. Wang, M.; Zhang, M.; Fu, L.; Lin, J.; Zhou, X.; Zhou, P.; Huang, P.; Hu, H.; Han, Y. Liver-targeted delivery of TSG-6 by calcium phosphate nanoparticles for the management of liver fibrosis. *Theranostics* **2020**, *10*, 36–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Huang, Y.F.; Chen, M.J.; Wu, M.H.; Hung, S.C. The use of hypoxic cultured mesenchymal stem cell for oncolytic virus therapy. *Cancer Gene Ther.* **2013**, *20*, 308–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wynn, R.F.; Hart, C.A.; Corradi-Perini, C.; O'Neill, L.; Evans, C.A.; Wraith, J.E.; Fairbairn, L.J.; Bellantuono, I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* **2004**, *104*, 2643–2645. [[CrossRef](#)]
18. Hung, S.-C.; Pochampally, R.R.; Hsu, S.-C.; Sanchez, C.; Chen, S.-C.; Spees, J.; Prockop, D.J. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Tsai, C.-C.; Chen, Y.-J.; Yew, T.-L.; Chen, L.-L.; Wang, J.-Y.; Chiu, C.-H.; Hung, S.-C. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* **2011**, *117*, 459–469. [[CrossRef](#)]
20. Huang, W.-H.; Chen, H.-L.; Yew, T.-L.; Lin, M.-W.; Hung, S.-C. Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in allogeneic recipients. *Cardiovasc. Res.* **2014**, *101*, 266–276. [[CrossRef](#)]
21. Xu, G.; McLeod, H.L. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3314–3324.
22. Chung-Faye, G.; Palmer, D.; Anderson, D.; Clark, J.; Downes, M.; Baddeley, J.; Hussain, S.; Murray, P.I.; Searle, P.; Seymour, L.; et al. Virus-directed, enzyme prodrug therapy with nitroimidazole reductase: A phase I and pharmacokinetic study of its prodrug, CB1954. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2662–2668. [[PubMed](#)]
23. Tietze, L.F.; Schmuck, K. Prodrugs for targeted tumor therapies: Recent developments in ADEPT, GDEPT and PMT. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3527–3547. [[CrossRef](#)]
24. Wu, P.; Wang, J.; Chen, C.; Chao, K.; Chang, M.; Chen, W.-M.; Hung, S. Early Passage Mesenchymal Stem Cells Display Decreased Radiosensitivity and Increased DNA Repair Activity. *Stem Cells Transl. Med.* **2017**, *6*, 1504–1514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rodrigues, N.R.; Rowan, A.; Smith, M.E.; Kerr, I.B.; Bodmer, W.F.; Gannon, J.V.; Lane, D.P. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7555–7559. [[CrossRef](#)]
26. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
27. Gul, H.; Marquez-Curtis, L.A.; Lo, J.; Jahroudi, N.; Turner, A.R.; Larratt, L.M.; Janowska-Wieczorek, A. The Potent Deacetylase Inhibitor Trichostatin a (TSA) Increases CXCR4 Expression in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells by Chromatin Remodelling. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **2008**, *112*, 3487. [[CrossRef](#)]
28. Sachs, M.D.; Ramamurthy, M.; van der Poel, H.; Wickham, T.J.; Lamfers, M.; Gerritsen, W.; Chowdhury, W.; Li, Y.; Schoenberg, M.P.; Rodriguez, R. Histone deacetylase inhibitors upregulate expression of the coxsackie adenovirus receptor (CAR) preferentially in bladder cancer cells. *Cancer Gene Ther.* **2004**, *11*, 477–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Deak, E.; Seifried, E.; Henschler, R. Homing pathways of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their role in clinical applications. *Int. Rev. Immunol.* **2010**, *29*, 514–529. [[CrossRef](#)]
30. Kang, S.K.; Shin, I.S.; Ko, M.S.; Jo, J.Y.; Ra, J.C. Journey of mesenchymal stem cells for homing: Strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells Int.* **2012**, *2012*, 342968. [[CrossRef](#)]
31. Lourenco, S.; Teixeira, V.H.; Kalber, T.; Jose, R.J.; Floto, R.A.; Janes, S.M. Macrophage migration inhibitory factor-CXCR4 is the dominant chemotactic axis in human mesenchymal stem cell recruitment to tumors. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 3463–3474. [[CrossRef](#)]
32. Gul, H.; Marquez-Curtis, L.A.; Jahroudi, N.; Lo, J.; Turner, A.R.; Janowska-Wieczorek, A. Valproic acid increases CXCR4 expression in hematopoietic stem/progenitor cells by chromatin remodeling. *Stem Cells Dev.* **2009**, *18*, 831–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Ahmed, D.; Eide, P.W.; Eilertsen, I.A.; Danielsen, S.A.; Eknaes, M.; Hektoen, M.; Lind, G.E.; Lothe, R.A. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* **2013**, *2*, e71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Grove, J.I.; Searle, P.F.; Weedon, S.J.; Green, N.K.; McNeish, I.A.; Kerr, D.J. Virus-directed enzyme prodrug therapy using CB1954. *Anticancer Drug Des.* **1999**, *14*, 461–472.
35. Buijs, P.R.; Verhagen, J.H.; van Eijck, C.H.; van den Hoogen, B.G. Oncolytic viruses: From bench to bedside with a focus on safety. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2015**, *11*, 1573–1584. [[CrossRef](#)]
36. Dominici, M.; le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Gurgul, A.; Opiela, J.; Pawlina, K.; Szmatoła, T.; Bochenek, M.; Bugno-Poniewierska, M. The effect of histone deacetylase inhibitor trichostatin A on porcine mesenchymal stem cell transcriptome. *Biochimie* **2017**, *139*, 56–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Samiec, M.; Opiela, J.; Lipiński, D.; Romanek, J. Trichostatin A-mediated epigenetic transformation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells biases the in vitro developmental capability, quality, and pluripotency extent of porcine cloned embryos. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 814686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kalimuthu, S.; Oh, J.M.; Gangadaran, P.; Zhu, L.; Lee, H.W.; Rajendran, R.L.; Baek, S.H.; Jeon, Y.H.; Jeong, S.Y.; Lee, S.-W.; et al. In Vivo Tracking of Chemokine Receptor CXCR4-Engineered Mesenchymal Stem Cell Migration by Optical Molecular Imaging. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 8085637. [[CrossRef](#)]
40. Jeun, S.-S.; Park, S.A.; Ryu, C.H.; Kim, S.M.; Lim, J.Y.; Park, S.I.; Jeong, C.H.; Jun, J.A.; Oh, J.H.; Park, S.H.; et al. CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 97–103. [[CrossRef](#)]
41. Stoff-Khalili, M.A.; Rivera, A.A.; Mathis, J.M.; Banerjee, N.S.; Moon, A.S.; Hess, A.; Rocconi, R.P.; Numnum, T.M.; Everts, M.; Chow, L.T.; et al. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *105*, 157–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nakao, S.; Arai, Y.; Tasaki, M.; Yamashita, M.; Murakami, R.; Kawase, T.; Amino, N.; Nakatake, M.; Kurosaki, H.; Mori, M.; et al. Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaax7992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Saha, D.; Martuza, R.L.; Rabkin, S.D. Macrophage Polarization Contributes to Glioblastoma Eradication by Combination Immunovirotherapy and Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 253–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]